

*Zur Analytik der Senfölglycoside und des
Allylsenföls in Senfsamen und Speisesenf
unter Berücksichtigung des Bitterseins
von Speisesenf*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
FRANZ NIMFÜHR
München

1967

*Zur Analytik der Senfölglycoside und des
Allylsenföls in Senfsamen und Speisesenf
unter Berücksichtigung des Bitterseins
von Speisesenf*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
FRANZ NIMFÖHR
München



1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Springer
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h. c. E. Bamann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. Februar 1967

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München in der Zeit vom 1. Januar 1963 bis 31. März 1966 durchgeführt.

Die Anregung zu dieser Arbeit erhielt ich von Herrn Professor Dr. Rudolf SPRINGER, dem ich für die wertvolle Lenkung meiner Studien, die stete Anteilnahme und seinen Rat bei allen auftauchenden Fragen und Schwierigkeiten herzlich danken möchte.

Ebenso bringe ich Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Eugen BAMANN, Direktor des Institutes für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, für die sachliche Unterstützung und die vielseitige Förderung meiner Studien meinen aufrichtigen Dank zum Ausdruck.

Ferner möchte ich dem Verband der deutschen Senfindustrie für die vielseitige materielle Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit herzlich danken.

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einführung und Vorbemerkungen

B. Ergebnisse der Untersuchungen

1. Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
a) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
b) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
c) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
d) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
e) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
f) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
g) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
h) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
i) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
j) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
k) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
l) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
m) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
n) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
o) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
p) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
q) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
r) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
s) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
t) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
u) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
v) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
w) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
x) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
y) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände
z) Darstellung der verschiedenen Untersuchungsgegenstände

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einführung und Problemstellung	1
B. Ergebnisse der Untersuchungen	5
I. Entwicklung und quantitative Auswertung chromatographischer Trennverfahren zur Bestimmung der Senfölglycoside Sinigrin und Sinalbin	5
1. Papierchromatographische Differenzierung der Glucoside und des Sinapins	
2. Bestätigung der Ergebnisse papierchromatographischer Untersuchungen durch die Dünnschichtchromatographie - Nachweis anderer Inhaltsstoffe	8
3. Charakteristik der Glycoside Sinigrin und Sinalbin durch ihre Absorption im UV-Bereich	14
4. Quantitative Erfassung von Sinigrin und Sinalbin in Gemischen von Reinglycosiden, in Senfsamen und Speisesenfprouben auf Grund ihrer Absorption im UV-Bereich	18
II. Weiterentwicklung bekannter und Ausarbeitung neuer Verfahren zur Bestimmung des Allylsenföls	22
1. Vergleichende Beurteilung der maßanalytischen Methoden Wajahns, des DAB VI und der Pharmacopoea Helvetica V	22
a. Unter Verwendung frisch destillierten Allylsenföls	22
b. Unter Verwendung von Reinglycosid und Samen, gleichzeitig Ermittlung der Reaktionsbedingungen einer optimalen Senfölbildung	23
2. Quantitative Erfassung des Allylsenföls auf Grund der UV-Absorption des mit Ammoniak gebildeten Allylthioharnstoffs	27
3. Vergleich der Ergebnisse der Allylsenfölbestimmungen in den Samen des braunen Senfs mittels einer variierten Hypojodit-Methode und des spektral-photometrischen Verfahrens	30
4. Allylsenfö- und Sinigringehalte in Speisesenfprouben verschiedener Herkunft ermittelt mit Hilfe der erarbeiteten Methoden	31

III. Erarbeitung einer Bestimmungsmethode des Sinalbins auf der Grundlage der enzymatischen Spaltung des Glucosids unter Rhodanidbildung - Rhodanid-Methode	34
1. Nachweis des in Sinalbinlösung durch Myrosinase und in Gelbsenfansätzen entstehenden Rhodanids mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie	34
2. Entwicklung einer Bestimmungsmethode für das enzymatisch aus Sinalbin gebildete Rhodanid	36
3. Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen für die Spaltung des Sinalbins unter Rhodanidbildung	39
a. Einfluß des pH-Werts auf den Ablauf der enzymatischen Spaltung	39
b. Die Ermittlung des Temperaturoptimums der enzymatischen Rhodanidbildung	40
4. Erprobung der Rhodanid-Methode an Reinglucosid	41
5. Sinalbingehalte von Gelbsenfsamen unterschiedlicher Herkunft ermittelt mit Hilfe der erarbeiteten Methode	41
6. Sinalbingehalte in Speisesenfproben - Verhalten des p-Hydroxybenzylsenföls bei Anwendung der Rhodanid-Methode	42
IV. Unterscheidung von Gelb- und Braunsenf mit Hilfe der Eisen-(III)-chlorid-Reaktion	44
1. Verhalten der Samen und der Reinglucoside	44
2. Nachweis von Gelbsenf in Speisesenfproben	45
V. Untersuchungen über den bitteren Geschmack des Senfs	46
1. Beschreibung des Phänomens "bitterer Geschmack" in Speisesenf	46
a. Vorübergehende Bitterkeit	46
b. Bleibende Bitterkeit	46

	Seite
2. Befunde organoleptischer Untersuchungen an Speisesenfproben, Senfsamen, Glucosiden und Sinapinrhodanid	46
a. Speisesenf industrieller Herkunft	46
b. Gelb- und Braunsensamen	47
c. Die Senfölglycoside Sinigrin und Sinalbin	47
d. Sinapinrhodanid	48
3. Abnahme des bitteren Geschmacks in Abhängigkeit vom Umfang der Glucosidspaltung	48
a. Beobachtungen an Reinglucosiden	48
b. Beobachtungen an selbst hergestellten Speisesenfproben	49
c. Untersuchung eines bitteren, industriell hergestellten Speisesenfs	51
C. Diskussion der Untersuchungsergebnisse	52
D. Experimenteller Teil	68
I. Herstellung und Reinigung eines Myrosinase-Präparats	68
II. Gewinnung der Glucoside Sinigrin und Sinalbin	68
III. Darstellung von Sinapinrhodanid aus Braunsensamen	69
IV. Zubereitung der Speisesenfproben	70
V. Gewinnung der methanolischen und wässrigen Auszüge der Senfsamen und Speisesenfproben	70
1. Wässrige Auszüge	70
2. Methanolische Extrakte	70
a. Samen	70
b. Speisesenf	71
VI. Analytisch-chemische und physikalisch-chemische Verfahren	71
1. Papierchromatographische Untersuchungen	71

	Seite
a. Qualitative Trennung der Glucoside	71
b. Durchführung der quantitativen Bestimmungen	72
2. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	74
a. Trennung der Glucoside	74
b. Nachweis des Cholins und des Sinapins	74
c. Nachweis des Rhodanids	75
3. Maßanalytische Bestimmung des Allylsenföls	75
a. Verfahren nach dem DAB VI	75
b. Verfahren nach der Pharmacopoea Helvetica V	75
c. Verfahren nach Wojahn (Hypoioditmethode)	75
4. Maßanalytische Bestimmung des Allylsenföls in Senfsamen und Speisesenf - Erfassung des Restsinigrins	75
a. Gehaltsbestimmung in den Senfsamen	75
b. Gehaltsbestimmung in Speisesenf	76
c. Bestimmung des Restsinigrins in Speisesenf	77
5. Spektralphotometrische Bestimmung des Allylsenföls auf Grund der UV-Absorption des Thioharnstoff-Derivates	77
a. Bestimmung des Allylsenfölgehaltes in den Samen	77
b. Bestimmung des Allylsenfölgehaltes in Speisesenf - Ermittlung des Restsinigrinanteils	77
6. Rhodanid-Methode zur Bestimmung des Sinalbins	78
a. Erstellung einer Eichkurve	78
b. Ermittlung des Temperaturoptimums der enzymatischen Rhodanidbildung	79
c. Überprüfung der Methode unter Verwendung von Reinglucosid	79
d. Gehaltsbestimmung in Gelbsenfsamen	80
e. Bestimmung des Restsinalbins in Speisesenf	80
E. Zusammenfassung	81
Literaturverzeichnis	I-V

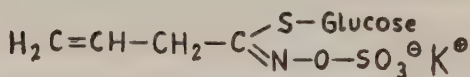
A. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Verwendung der Senfsamen, zunächst als Arzneimittel, später als Gewürz, reicht schon in früheste Zeiten zurück. Bereits im Neuen Testament wird das Senfkorn mehrfach erwähnt. Griechische und römische Autoren beschreiben den Senf als Heil- und Gewürzpflanze. So empfiehlt der römische Arzt PEDANIUS DIOSCORIDES 78 n. Chr. "Sinepi" als Einreibung. COLUMELLA (1. Jht. n. Chr.), der in "De re rustica" Ackerbau und Viehzucht seiner Zeit aufzeichnet, berichtet erstmals über die Herstellung eines würzenden Senfbreies. Spätestens im neunten Jahrhundert findet der Senf in Mitteleuropa Eingang, als KARL DER GROSSE im Jahre 812 in seiner Landgüterverordnung den Anbau von Senf verlangt. Um das Jahr 1000 dürfte die Herstellung von Speisesenf in weiten Teilen Europas üblich gewesen sein.

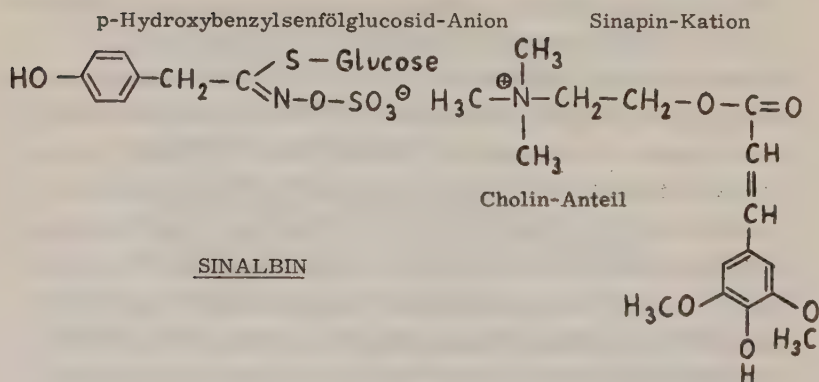
Der Leidener Arzt BOERHAVE destillierte 1730 erstmalig das im Senf enthaltene ätherische Öl ab und leitet damit die Erforschung der Inhaltsstoffe ein. In den folgenden 130 Jahren gelingt es mehreren Forschern aus den Samen des schwarzen Senfs einen kristallinen Stoff, das Glycosid Sinigrin, zu isolieren. WILL und KÖRNER (66) stellen 1863 eine Summenformel für das Sinigrin auf. - Das Glycosid des weißen Senfs gewinnen 1831 ROBIQUET und BOUTRON-CHARLARD. Bei der sauren Hydrolyse dieser Sinalbin genannten Verbindung erhalten sie einen reduzierenden Zucker und das nichtflüchtige, leicht verharzende p-Hydroxybenzylsenföl, dessen Struktur 1889 von SALKOWSKI (48) erkannt wird. Zehn Jahre zuvor hatten WILL und LAUBENHEIMER (67) nach genaueren Untersuchungen eine Summenformel für das Sinalbin angegeben. Sie ermittelten außerdem nach enzymatischer Spaltung mit dem von BUSSY (9) 1840 beschriebenen Ferment Myrosinase einen Zucker, Senföl und Sinapinbisulfat. Das Sinapin war bereits 1825 von HENRY und GAROT als Rhodanid dargestellt und von BABO und HIRSCHBRUNN (4) 1852 identifiziert worden. Erst die grundlegenden

Arbeiten GADAMERS (16) führen zu einem genaueren Bild über die bei der Spaltung der Senfölglycoside beteiligten Verbindungen. Es gelingt ihm, die genauen Strukturformeln als Sinigrins, des Sinalbins und des Sinapins aufzuklären. Sie erfuhren vor wenigen Jahren durch ETTLINGER und LUNDEEN (13) eine Berichtigung hinsichtlich der Verknüpfung der einzelnen Verbindungsgruppen im Molekül der Glycoside. SCHNEIDER, FISCHER und SPECHT (52) erkannten 1930 die Natur des Zuckers als β -D-Glucose.

Die Struktur der Senfölglycoside Sinigrin und Sinalbin sowie des Sinapins nach GADAMER, ETTLINGER und LUNDEEN:



SINIGRIN



SINALBIN

Sinapinsäure-Anteil

Die analytischen Verfahren zur quantitativen Bestimmung beschränken sich auf die Erfassung der flüchtigen Senföle, hauptsächlich des Allylsenföls. Die Resultate der verschiedenen Methoden weisen Unstimmigkeiten auf. Eine analytische Bestimmung des Sinalbins und des p-Hydroxybenzylsenföls ist bisher noch nicht möglich. BAUER und HOLLE (5) geben zwar ein Verfahren an, das auf der Ermittlung des aus Sinalbin gebildeten Sulfats beruht, doch dürften die Ergebnisse der Untersuchungen mit 9 bis 15 % Sinalbin in den Samen des weißen Senfes zu hoch liegen, selbst wenn man eine gewisse biologische Schwankungsbreite in Rechnung stellt. Nach GADAMER (16), der das Sinalbin durch erschöpfende Extraktion der Samen des weißen Senfes auch präparativ gewann, enthalten diese etwa 2,5 % Sinalbin. Auf ähnlichem Wege erhält ROJAHN (47) eine Ausbeute von 2,0 %. HALBACH (20) errechnet auf Grund der Sinapinbestimmung von BEK (6) einen Sinalbingehalt von 1,7 %.

Die Zubereitung des Speisesenfs erfolgt, je nach Geschmacksrichtung, aus wechselnden Mengen Gelb- und Braunsenf ¹⁾ unter Zusatz von Essig, Salz und Gewürzen rein empirisch. Sieht man von der Möglichkeit grober Verfälschungen ab, so stellen die Glycoside Sinigrin und Sinalbin sowie die bei der enzymatischen Spaltung durch Myrosinase daraus gebildeten Senföle die wertbestimmenden Faktoren dar. Die bisher bekannten Methoden gestatten lediglich eine quantitative Bestimmung des aus dem Braunsenfanteil stammenden Allylsenföls, welche mit Hilfe des argentometrischen Verfahrens nach dem DAB VI, oder jodometrisch nach der Pharmacopoea Helvetica V vorgenommen werden kann. Beide Verfahren sind Konventionsmethoden, die restlose Erfassung des Sinigrins bzw. Allylsenöls im Speisesenf scheint daher fraglich.

1) Der weiße Senf (*Sinapis alba*) wird als Gelbsenf, der schwarze Senf (*Brassica nigra*) als Braunsenf bezeichnet.

Durch die Ausarbeitung geeigneter Verfahren zur Ermittlung der Glycoside Sinigrin und Sinalbin und des Allylsenföls werden der Analytik auf diesem Gebiet neue Wege gewiesen.

Es gelingt ferner die bisher nicht erforschte Ursache des Bitterwerdens von Speisesenf aufzuklären und auf die Erhaltung eines bestimmten Restglycosidanteils, vor allem des Sinigrins, zurückzuführen, das einen stark bitteren Geschmack aufweist. Diese Eigenschaft ist beim Sinalbin weit schwächer ausgeprägt, dafür tritt hier eine adstringierende Wirkung in den Vordergrund.

B. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN

I. Entwicklung und quantitative Auswertung chromatographischer Trennverfahren zur Bestimmung der Senfölglicoside Sinigrin und Sinalbin

1. Papierchromatographische Differenzierung der Glucoside und des Sinapins

Die Trennung gelingt unter Einhaltung folgend beschriebener im einzelnen ermittelter Bedingungen:

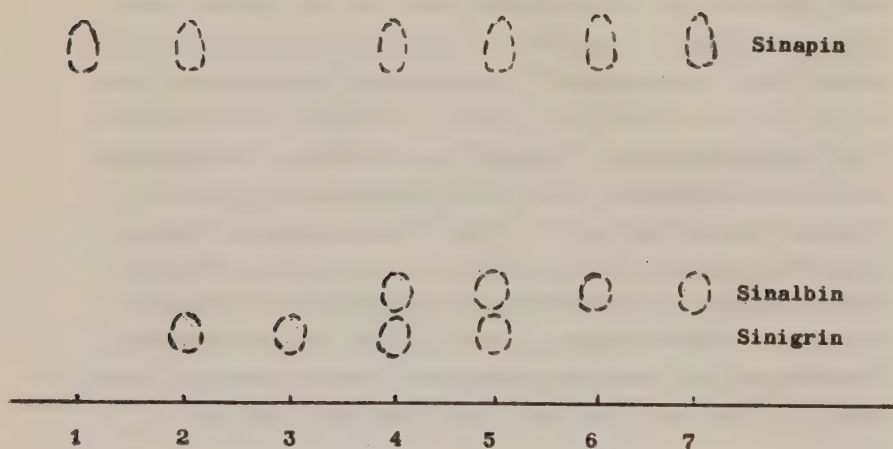
Als Fließmittel dient bei absteigender Anordnung die Oberphase eines Gemischs aus n-Butanol, Essigsäure und Wasser im Verhältnis 40:10:30, das auf Grund umfangreicher Untersuchungen als das geeignetste erkannt wurde. Die Herabsetzung des Wasseranteils in diesem System gegenüber dem sonst gebräuchlichen Fließmittel aus den gleichen Bestandteilen im Verhältnis 40:10:50 bewirkt eine leichte Erhöhung der R_f -Werte der Glucoside und des Sinapins. Die weitere Verminderung des Wassergehalts führt zu einer unerwünschten Streifenbildung. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, das Fließmittel nicht sogleich nach dem Mischen zu verwenden, sondern einige Tage stehen zu lassen. Andere Fließmittelkombinationen, die n-Propanol, Isopropanol, Äthanol, Methanol, Aceton, Äther oder Chloroform enthalten, zeigen keine gute Trennwirkung.

Als Sprühmittel bewährt sich ein Gemisch von etwa 1n AgNO_3 -Lösung und 10 %-igem Ammoniak im Verhältnis 1:1. Nach jeweils dreimaligem Besprühen und Erhitzen im Trockenschrank bei 120°C erscheinen die Glucoside als grauviolette Flecken. Das Sinapin zeigt sich zunächst als gelber Fleck, der beim Erwärmen eine braune Farbe annimmt und sich gegenüber dem gelblich braunen Grund des Chromatogramms nach dem Erhitzen nur noch schwach abhebt. Das Sinapin läßt sich außerdem im UV-Licht infolge blaugrüner Fluoreszenz identifizieren (Abb. 1).

Die Ergebnisse zahlreicher Testversuche lehrten, daß einer quantitativ auswertbaren Trennung der Senfölglycoside des Gelb- und Braunsenfes umfangreiche Versuche unter Verwendung von Reinglycosiden vorausgehen müssen. Als Bezugssubstanzen wurden zunächst nach der Vorschrift GADAMERS (16) selbst hergestellte Glycoside angewandt, später standen Reinglycoside der Firma Maybach zur Verfügung. Nach Ermittlung geeigneter Trennbedingungen unter dem Gesichtspunkt einer quantitativen Auswertung wurden Samen- und Speisesenfauszüge in die Untersuchungen einbezogen.

Abbildung 1

Papierchromatographische Trennung der Senfölglycoside



- | | |
|------------------------------------|-------------------------------|
| 1. Sinapinrhodanid | 5. wässriger Speisesenfauszug |
| 2. methanolischer Braunsenfauzug | 6. Sinalbin |
| 3. Sinigrin | 7. methanolischer Gelbsenf- |
| 4. methanolischer Speisesenfauszug | auszug |

Versuchsbedingungen S. 71

Die eigenen Befunde bestätigen im wesentlichen die Ergebnisse von O.E. SCHULTZ und R. GMELIN (53), die erstmals eine papierchromatographische Trennung der Senfölglycoside durchführten. Die von den Autoren unter Verwendung der aufsteigenden Methode nach WILLIAMS und KIRBY (68) erzielten R_f -Wert-Unterschiede zwischen Sinigrin und Sinalbin reichen zwar für eine qualitative Differenzierung aus, erlauben aber keine quantitative Auswertung der Chromatogramme auf der Grundlage einer Elution der Flecken und nachfolgender Messung der UV-Absorption (S. 72). Bei begrenzter Laufstrecke sind unter den Versuchsbedingungen die R_f -Werte gegenüber den Ergebnissen von SCHULTZ und GMELIN (53) leicht erhöht. Durch die Herabsetzung des Wasseranteils im Fließmittelsystem n-Butanol-Essigsäure-Wasser und vor allem den Übergang zur absteigenden Chromatographie lassen sich jedoch die beiden Glycoside räumlich so weit voneinander trennen, daß eine klare Abgrenzung in Sinigrin- und Sinalbinzonen aus einem aufgetragenen Gemisch möglich wird. Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist die Anwendung des Durchlaufverfahrens, das eine größere Laufstrecke und damit auch eine bessere Auftrennung der Glycoside gestattet.

Tabelle 1:

R_f -Werte des Sinigrins, Sinalbins und des Sinapins

Papiersorte	Sinigrin	Sinalbin	Sinapin
2043b säure- gewaschen	0, 12-0, 15	0, 23-0, 26	0, 68-0, 71
598 g	0, 14-0, 16	0, 25-0, 28	0, 70-0, 72

Versuchsanordnung S. 71

Mit Papier der Sorte 598 g (Schleicher und Schüll) läßt sich zwar die Laufzeit der Chromatogramme beträchtlich verkürzen, die Flecken sind aber besonders bei größerer Laufstrecke der Glycoside diffuser als bei Verwendung der Sorte 2043b. Andere Papierarten einschließlich Glasfaserpapier waren weit weniger günstig bzw. ungeeignet.

Die umfassenden papierchromatographischen Untersuchungen, die O. E. SCHULTZ und R. GMELIN (53 - 56), sowie A. KJAER zusammen mit R. GMELIN, CONTI, MARCUS, LARSEN, JENSEN und RUBINSTEIN (23 - 35) an einer großen Anzahl senföglycosidhaltiger Pflanzen durchführten, berücksichtigen auch *Brassica nigra* und *Sinapis alba*. KJAER und Mitarbeiter gehen dabei meist von den Thioharnstoff-Derivaten der bei der enzymatischen Spaltung entstehenden Senföle aus, während SCHULTZ und GMELIN außerdem die ursprünglich vorhandenen Glycoside chromatographieren. Die Verwendung einer ammoniakalischen Silbernitratlösung als Sprühreagenz geht auf O. E. SCHULTZ und R. GMELIN (53) zurück.

Bei der Untersuchung wässriger und methanolischer Speisesenfauszüge gelingt der Nachweis von Sinigrin und Sinalbin in Senfzubereitungen. Sinigrin kann nur in frischen Proben, bei scharfen Senfarten zum Teil auch noch nach drei bis vier Wochen festgestellt werden, während Sinalbin in sämtlichen untersuchten Proben nachweisbar ist. Hieraus folgt, daß die enzymatische Spaltung der Senföglycoside, vor allem des Sinalbins, bei der Zubereitung des Speisesenfs nicht vollständig verläuft und erst im Laufe der Zeit weiter fortschreitet.

2. Bestätigung der Ergebnisse papierchromatographischer Untersuchungen durch die Dünnschichtchromatographie - Nachweis anderer Inhaltsstoffe

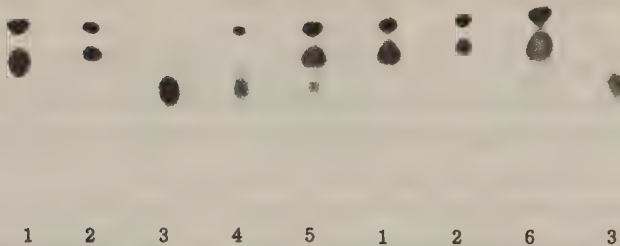
Die Ergebnisse der Trennversuche mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie bestätigen im Prinzip die Befunde der papierchromatographischen Untersuchungen. Die besten Trennergebnisse liefert im Zuge der Ermittlung geeigneter Bedingungen das Fließmittel n-Butanol-Essigsäure-Wasser 40:10:50 (Oberphase), wenn man die Chromatogramme dreimal

nach zwischenzeitlichem Trocknen bis nahe an den oberen Rand der Platte laufen läßt. Diese Maßnahme ist deshalb notwendig, weil die R_f -Werte des Sinigrins und Sinalbins und zugleich auch die R_f -Wert-Differenzen beider Glycoside klein sind. Sie läßt sich durch die Verwendung einer Durchlaufkammer umgehen. Die Laufzeit beträgt dann 6 - 8 Stunden. Die Anwesenheit von Essigsäure im Fließmittel trägt nicht nur zu einer Stabilisierung vor allem des basenempfindlichen Sinalbins bei, sondern bewirkt auch eine wesentlich bessere Trennschärfe der beiden Glycoside voneinander, deren R_f -Werte immer nahe zusammenliegen.

Die Identifizierung der Glycoside und des Sinapins erfolgt wie bei den Papierchromatogrammen durch mehrmaliges Besprühen mit ammoniakalischer AgNO_3 -Lösung und anschließendes Erwärmen auf $120 - 140^\circ \text{C}$. Sinigrin, Sinalbin und das Sinapin erscheinen anfangs zögernd, dann deutlich als schwarze Flecken auf weißem Grund. Das Sinapin nimmt beim Besprühen mit Alkalien zunächst eine gelbe Farbe an, die auf das Entstehen der unbeständigen, freien Base Sinapiniumhydroxyd zurückzuführen ist. Außerdem läßt sich auch hier das Sinapin an seiner blaugrünen Fluoreszenz erkennen. Die Glycosidflecken sind klein, konzentriert und scharf voneinander getrennt, obwohl Sinigrin, Sinalbin sowie das Sinapin nahe aufeinander folgen (Abb. 2). Die Glycoside können auch mit braun-violettem Farbton in Erscheinung treten. Hierbei spielt die Konzentration der aufgetragenen Glycoside und die Menge der aufgesprühten ammoniakalischen Silbernitratlösung eine Rolle. Während bei den Papierchromatogrammen die Menge des Sprühmittels sorgfältig zu bemessen ist, da sich sonst schon nach dem ersten Erhitzen die Chromatogramme mit einer tiefbraunen Schicht überziehen, die das Erkennen der Glycosidflecken erschwert, wenn nicht sogar unmöglich macht, gestatten die Dünnschichtchromatogramme in dieser Beziehung einen größeren Spielraum. Allgemein empfiehlt sich jedoch auch hier die Regel, beim ersten Besprühen nicht zuviel Reagenz aufzutragen. Die Glycoside und das Sinapin erscheinen von unten nach oben in der Reihenfolge: Sinigrin - Sinalbin - Sinapin (Abb. 2).

Abbildung 2

Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Senfölglycoside und des Sinapins in Senfsamen und in Speisesenf



1. methanolischer Gelbsenfauszug
2. Sinalbin
3. Sinigrin
4. methanolischer Braunsenfauszug
5. methanolischer Auszug eines frischen Speisesenfs
6. methanolischer Auszug eines älteren Speisesenfs des Handels

Versuchsbedingungen S. 74

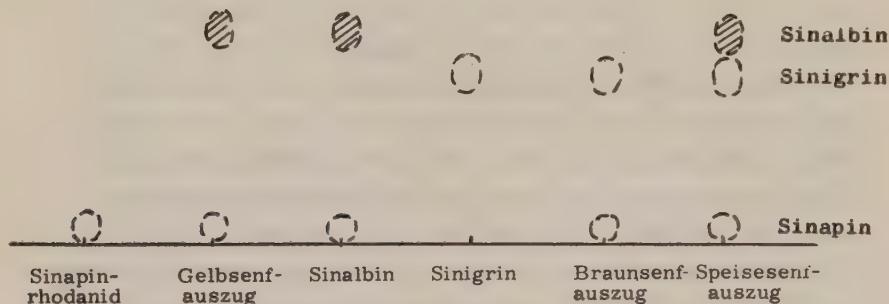
Bei Verwendung methanolischer Auszüge der Senfzubereitungen ist auch hier das Sinalbin in allen untersuchten Speisesenfarten nachweisbar, während Sinigrin in frischen Proben deutlich, in älteren nur noch in Spuren aufzufinden ist (Abb. 2). Durch den Nachweis der ungespaltenen Glycoside ist erneut bewiesen, daß die enzymatische Spaltung der Glycoside bei der üblichen Herstellung nur unvollkommen verläuft.

Als ein weiteres System, das eine Trennung der Senfölglycoside unter einmaligem Entwickeln in der Chromatographierkammer erlaubt, wurde das Laufmittelgemisch Isopropanol-Essigsäure-Wasser erkannt. Mit steigendem Wassergehalt im Gemisch erhöhen sich die R_f -Werte des Sinigrins und Sinalbins. Die günstigste R_f -Wert-Differenz weisen jedoch Chromatogramme auf, die mit der Mischung Isopropanol-Essigsäure-Wasser 80:20:10 hergestellt sind: Während das Sinapin hierbei fast an der Startlinie sitzen bleibt, liegen die R_f -Werte für Sinigrin und Sinalbin bei 0,33 und 0,40 (Abb. 3). Bei der Identifizierung der Glycoside ist dieser große Abstand zum Sinapin vorteilhaft. Die Schärfe, mit der die beiden Glycoside getrennt werden, ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei Verwendung des butanolhaltigen Fließmittels nach dreimaligem Laufen. Die Flecken sind diffuser und fließen bei der Trennung von Glycosidgemischen teilweise ineinander. In ungünstigen Fällen ist daher das Erkennen der einzelnen Glycoside im Speisesenf erschwert. In methanolischen Auszügen der Senfsamen lassen sich Sinigrin und Sinalbin jedoch gut nachweisen.

Wie bei der Papierchromatographie führt auch bei der Dünnschichtchromatographie die Anwendung reiner Lösungsmittel für das Entwickeln der Chromatogramme zu keiner Trennung der Glycoside. Mit Chloroform, Äther und Essigsäure wandern sie überhaupt nicht, in Aceton nur eine geringe Strecke, wobei zwischen Sinigrin und Sinalbin kein R_f -Wert-Unterschied besteht. Letzteres zeigt sich bei Trennversuchen unter Verwendung einer Durchlaufkammer. Wasser, Methanol, Äthanol, n-Propanol, Isopropanol und n-Butanol sind ebenfalls nicht geeignet, da die Glycoside mit der Fließmittelfront laufen oder Streifenbildung eintritt. Basische Fließmittel kommen für eine Trennung nicht in Frage, da besonders das Sinalbin basenempfindlich ist und zerstört wird. Auch mit Gemischen aus zwei Bestandteilen der oben genannten Substanzen läßt sich keine Trennung erreichen.

Abbildung 3

Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Inhaltsstoffe unter Ver-
wendung methanolischer Samen- und Speisesenfauszüge



Versuchsbedingungen S. 74

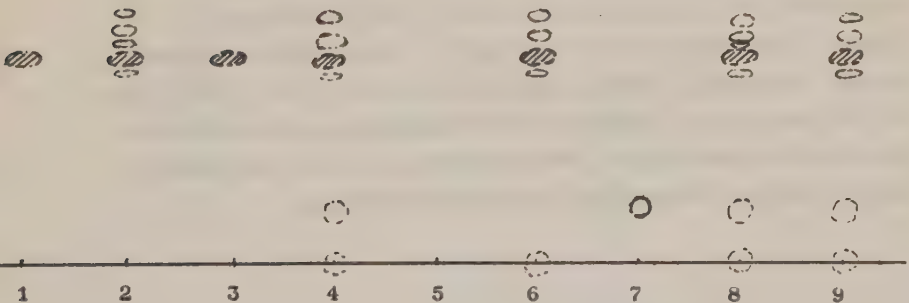
Vor kurzer Zeit gelang WAGNER, HÖRHAMMER und NUFER (63) eine dünnschichtchromatographische Auftrennung verschiedener Senfölglycoside. Die Autoren verwenden das Fließmittel n-Butanol-n-Propanol-Essigsäure-Wasser 3:1:1:1 und geben mit Trichloressigsäure/Kaliumhexacyanoferrat (III)/Eisen-III-chlorid ein neues Reagenzgemisch zum Nachweis der Glucoside an. In der Reihe steigender R_f -Werte der untersuchten Glucoside folgen Sinigrin und Sinalbin unmittelbar aufeinander. Auch nach unseren Befunden liegen die beiden Glucoside immer relativ nahe zusammen. Die Untersuchungen, welche besonders auf die Analyse von Pflanzenextrakten und der entsprechenden Arzneispezialitäten ausgerichtet sind, erfassen außerdem die Thioharnstoff-Derivate von Senfölen außer dem des praktisch nicht zugänglichen p-Hydroxybenzylsenföls, das dem Sinalbin zugrunde liegt.

Besprüht man Chromatogramme, die zweimal in n-Butanol-Essigsäure-Wasser 40:10:50 gelaufen sind, nicht mit $\text{AgNO}_3/\text{NH}_3$, das zur Identifizierung der Glycoside herangezogen wird (Abb. 2), sondern mit Dragendorff's Reagenz, so heben sich die beiden N-Basen Cholin und Sinapin deutlich ab, während Sinigrin und Sinalbin nicht erscheinen. Das Sinapin

weist eine leuchtend rote, Cholin eine rotviolette Farbe auf (Abb.4). Bemerkenswert ist das Auftreten des Cholins in Speisesenf und älteren Samenauszügen, während es in frischen fehlt. In den methanolischen Extrakten des Speisesenfs und der Samen treten oberhalb des Sinapins (Abb.4) noch weitere, schwächer ausgeprägte, rote Flecken hervor, die nicht näher identifiziert werden konnten. Hierbei zeigen sich feine Unterschiede zwischen Gelb- und Braunsenf, die jedoch so gering sind, daß sie für eine Differenzierung der beiden Senfarten nicht ausreichen.

Abbildung 4

Nachweis von Cholin und Sinapin in methanolischen Senfauszügen



- | | |
|--------------------------|--------------------------------|
| 1. Sinapinrhodanid | 6. Braunsenfauszug frisch |
| 2. Gelbsenfauszug frisch | 7. Cholinchlorid |
| 3. Sinalbin | 8. Gelbsenfauszug 10 Tage alt |
| 4. Speisesenfauszug | 9. Braunsenfauszug 10 Tage alt |
| 5. Sinigrin | |

Versuchsbedingungen S. 74

3. Charakteristik der Glycoside Sinigrin und Sinalbin durch ihre Absorption im UV-Bereich

Sinigrin und Sinalbin weisen bei 227 nm gleichartige, charakteristische Absorptionsmaxima auf, die auf die Senfölglycosidgruppierung, die beiden Molekeln gemeinsam ist, zurückgeführt werden müssen (Abb. 5 und 6). Das Sinalbin zeigt zudem noch im langwelligeren UV-Bereich eine ausgeprägte Absorption, deren Maximum bei 325 nm liegt (Abb. 5). Sie ist dem Sinapin-Kation zuzuordnen, da sie auch im Absorptionsspektrum des Sinapinrhodanids hervortritt (Abb. 6). Außerdem fehlt dieses Maximum beim Ersatz des Sinapin-Kations durch das Teramethylammonium-Ion im Spektrum des Sinalbins (Abb. 5).

Die Höhe der gemessenen Extinktion im Absorptionsmaximum bei 227 nm ist der vorgelegten Konzentration des entsprechenden Senfölglycosids proportional. Der Konzentrationsbereich für die Gültigkeit des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes bewegt sich beim Sinigrin zwischen 0,8 und 6 mg/100 ml, für das Sinalbin reicht er von 0,8 bis 2,4 mg/100 ml. Bei der Eintragung der Meßwerte in ein Koordinatensystem ergibt sich jeweils eine Gerade (Abb. 7). Für die Aufnahme der Absorptionsspektren wurden wässrige Lösungen der Glycoside herangezogen.

Abbildung 5

UV-Absorptionsspektren des Sinalbins (Sinapinium-Verbindung) und des Tetramethyl-ammonium-glucosinalbins

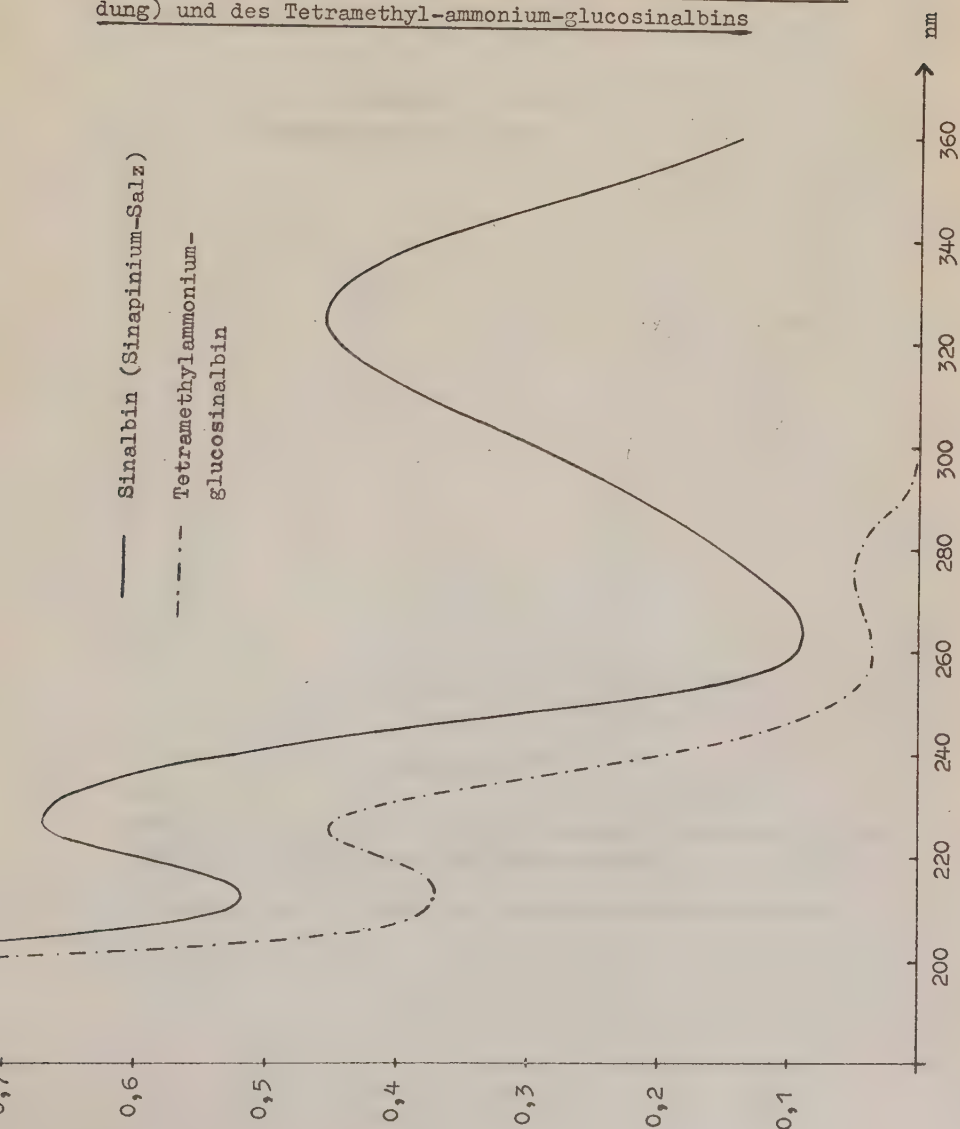
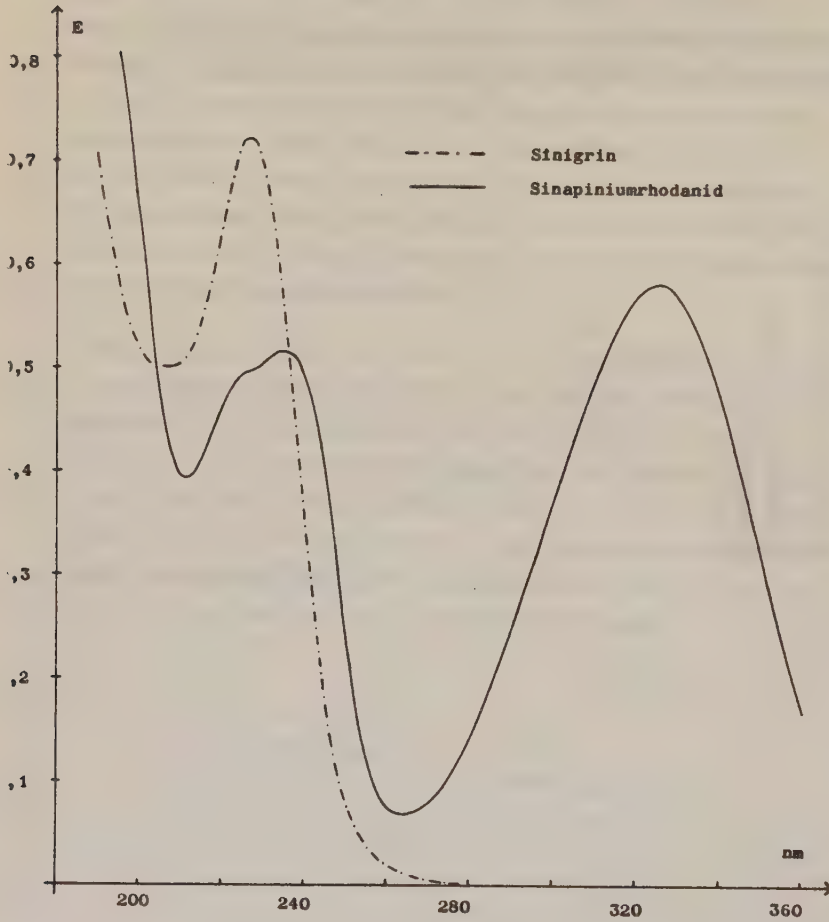


Abbildung 6

UV-Absorptionsspektren des Sinigrins und Sinapiniumrhodanids



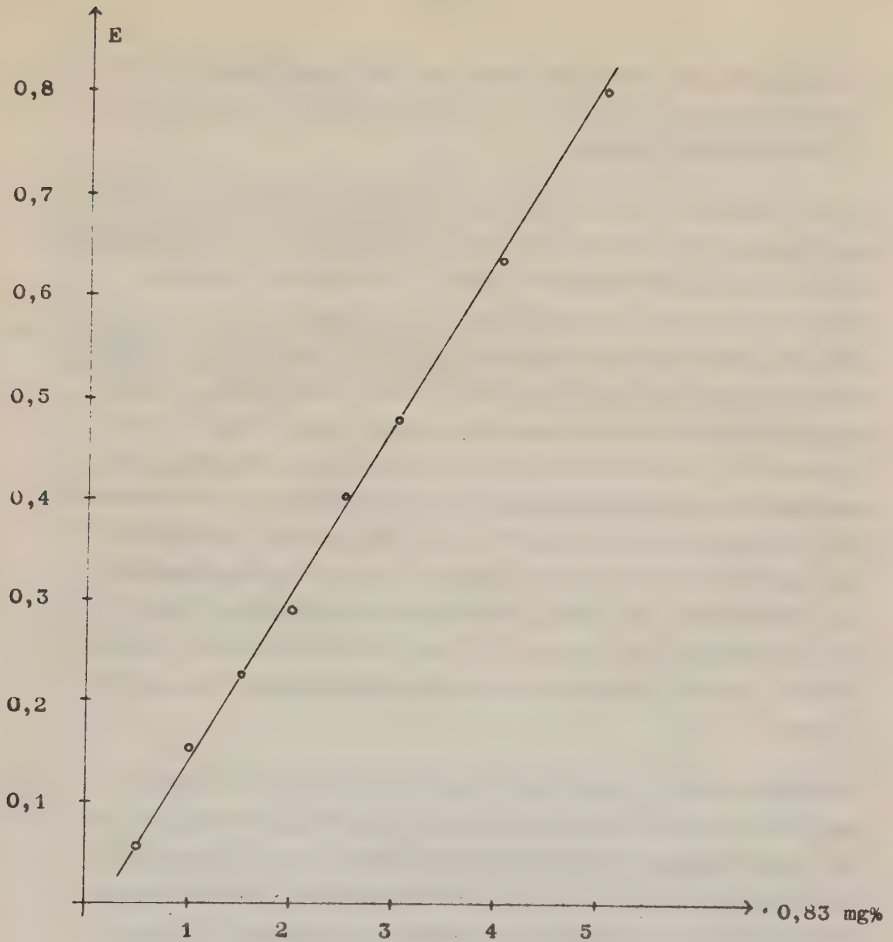


Abbildung 7

Eichgerade für die Sinigrinbestimmung

Die Messung der Extinktionen erfolgte im Absorptionsmaximum bei 227 nm

4. Quantitative Erfassung von Sinigrin und Sinalbin in Gemischen von Reinglycosiden, in Senfsamen und Speisesenproben auf Grund ihrer Absorption im UV-Bereich

Auf der Grundlage der oben beschriebenen Eigenschaften des Sinigrins und Sinalbins läßt sich eine quantitative Auswertung der papierchromatographisch getrennten Glycoside aufbauen. Die Lage der Flecken bestimmt man mit Hilfe von in gleicher Weise angelegten Vergleichschromatogrammen durch mehrmaliges Besprühen mit $\text{AgNO}_3/\text{NH}_3$ -Reagenz und darauffolgendes Erhitzen auf 120°C im Trockenschrank. Die Chromatogramme laufen nicht immer gleichmäßig. Daher erweist es sich als vorteilhaft, die beiden äußersten Randstreifen zur Ermittlung des jeweiligen Glycosidareals heranzuziehen. An dieser Stelle fällt auch die Entscheidung, ob die räumliche Trennung des Sinigrins vom Sinalbin eine quantitative Auswertung ermöglicht. Im allgemeinen genügen die Chromatogramme nach einer Laufzeit von 30 Stunden diesen Anforderungen. Da besonders das Sinalbin sehr ammoniakempfindlich ist, muß das Trocknen der Chromatogramme in einer ammoniakfreien Atmosphäre erfolgen.

Beim Eluieren der Flecken mit Methanol oder destilliertem Wasser gelangen Stoffe aus dem Papier in die Meßlösung, die im UV-Bereich ebenfalls absorbieren und die Messung der Extinktion der Glycoside beeinträchtigen (Abb. 5). Die Intensität der Störabsorption hängt von der Art und der Menge des zur Gewinnung des Eluats verwendeten Chromatographiepapiers sowie vom Elutionsmittel ab und steigt in Richtung kleinerer Wellenlängen an. Destilliertes Wasser nimmt im Vergleich zu Methanol wesentlich weniger Stoffe aus dem Papier auf, die eine Störabsorption im UV-Licht verursachen (Abb. 8). Wasser ist neben Methanol das beste Lösungsmittel für die Glycoside und wird daher als Elutionsmittel verwendet. Das Chromatographiepapier der Sorte 2043 b säuregewaschen (Fa. Schleicher & Schüll) weist im Meßbereich bei 227 nm die relativ geringste Störabsorption auf, deren Ausschaltung

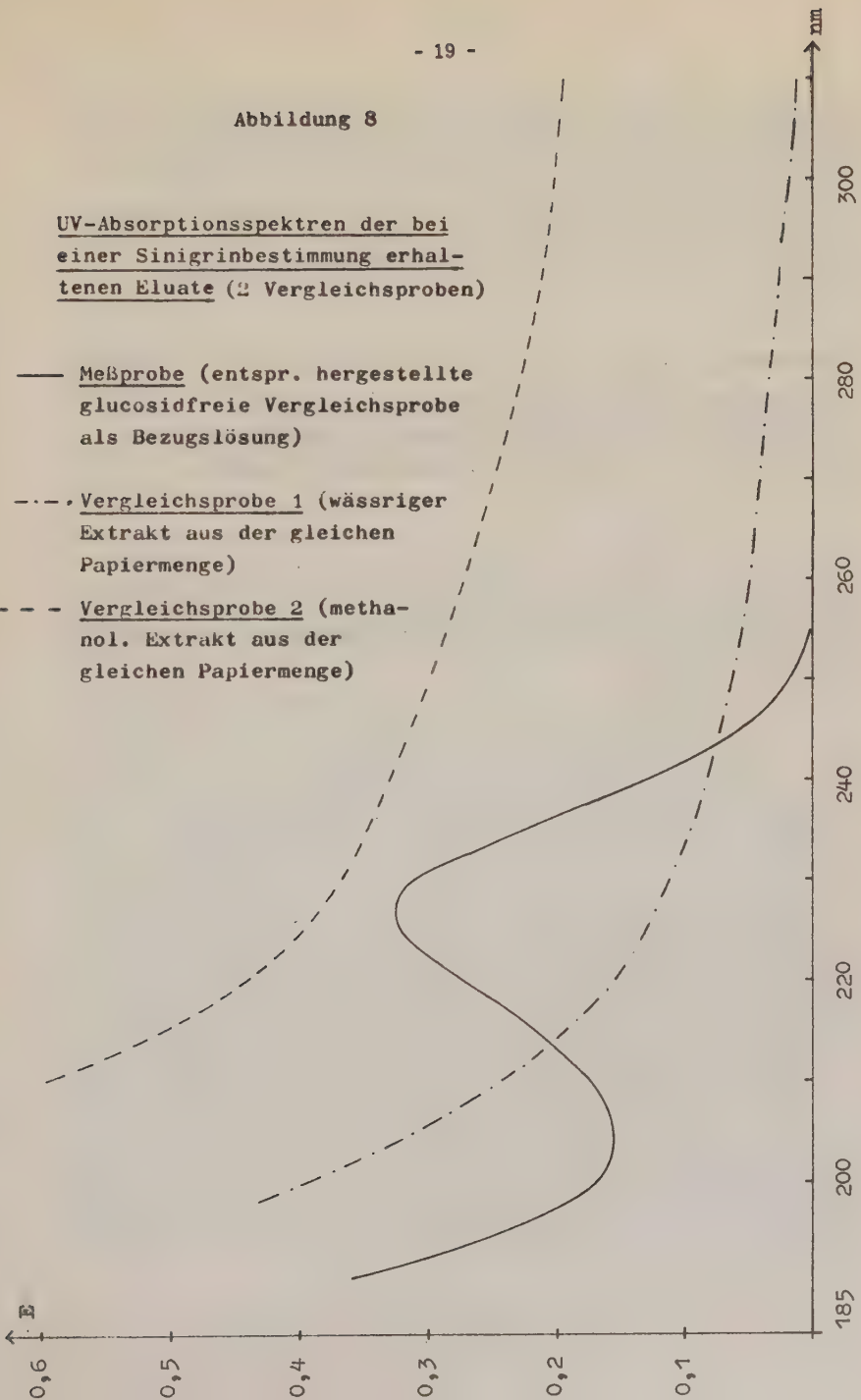
Abbildung 8

UV-Absorptionsspektren der bei einer Sinigrinbestimmung erhaltenen Eluate (2 Vergleichsproben)

— Meßprobe (entspr. hergestellte glucosidfreie Vergleichsprobe als Bezugslösung)

--- Vergleichsprobe 1 (wässriger Extrakt aus der gleichen Papiermenge)

- - - Vergleichsprobe 2 (methanol. Extrakt aus der gleichen Papiermenge)



durch die Verwendung von Vergleichsproben gelingt. Hierzu läßt man ein "leeres" Chromatogramm mitlaufen und schneidet auf der Höhe der Glycosidflecken die gleiche Menge Papier aus. Die Gewinnung des Eluats verläuft dann auf die gleiche Weise wie bei der Meßprobe (siehe Experimenteller Teil S. 72 und Diskussion der Untersuchungsergebnisse S. 53).

Die Ergebnisse der spektralphotometrischen Bestimmungen von Sinigrin und Sinalbin als Reinglycoside nach papierchromatographischer Trennung und darauffolgender Elution beider Glycoside mit destilliertem Wasser liegen zwischen 94 und 97 % der vorgelegten Mengen (Tabelle 2).

Tabelle 2:

Ergebnisse spektralphotometrischer Sinigrin- und Sinalbinbestimmungen nach papierchromatographischer Trennung und Elution der Glycoside mit destilliertem Wasser

Sinigrin			Sinalbin		
vorgelegte Menge mg	gefundene Menge		vorgelegte Menge mg	gefundene Menge	
	mg	%		mg	%
0, 96	0, 91	94, 8	1, 31	1, 24	94, 6
1, 23	1, 20	97, 5	1, 58	1, 48	93, 7
1, 92	1, 86	96, 9	1, 72	1, 64	95, 3
2, 26	2, 19	97, 0	1, 96	1, 85	94, 3
4, 52	4, 30	95, 1	2, 21	2, 10	95, 0

Versuchsanordnung S. 72

Für die Untersuchungen der Samen des gelben und braunen Senfs empfiehlt sich die Herstellung methanolischer Extrakte aus entfetteten, luftgetrockneten und staubfein zermahlenden Pulvern (siehe Experimenteller Teil S. 70). Für die verschiedenen Sorten Gelbsenf ergibt sich ein Sinalbingehalt von 2,09 bis 4,36 %. Der Sinigrinanteil der untersuchten Braunsenfproben bewegt sich zwischen 2,30 und 4,21 % (Tabelle 3).

Tabelle 3:

Ergebnisse spektralphotometrischer Senfölglycosidbestimmungen in den Samen des gelben und braunen Senfes nach papierchromatographischer Trennung

Braunsenf Sorte	Sinigrin %	Gelbsenf Sorte	Sinalbin %
Montana I	2,30	I	2,09
Montana II	4,21	II	3,41
Bari I	3,12	III	4,36
Bari II	3,52		

Versuchsordnung S. 72

Das Auffinden von Sinigrin und Sinalbin in Speisesenf beweist, daß die enzymatische Reaktion nicht immer quantitativ verläuft. Die Bestimmung des Sinigrins und Sinalbins in Speisesenf erhält den Charakter einer Restglycosidbestimmung. Das Sinalbin ist in allen untersuchten Proben zumindest qualitativ gut nachweisbar, während der Sinigrinanteil im allgemeinen sehr gering ist, nur in frischen Proben hervortritt und häufig ganz fehlt. In der Mehrzahl der Fälle ist daher eine chromatographische Sinigrinbestimmung nicht möglich und das Glycosid kann lediglich qualitativ in schwach positiver Reaktion nachgewiesen werden. Die Ergebnisse

schwanken je nach Art und Zustand des Speisesenfs. Für das Sinigrin ergeben sich Werte bis zu 0,17 %, beim Sinalbin von 0,05 bis 0,24 % (Tabelle 4).

Tabelle 4:

Der Gehalt an Sinigrin und Sinalbin in verschiedenen Speisesenfsproben

Speisesenfart	Sinigrin %	Sinalbin %
mild I	--	0,19
mild II	--	0,23
mittelscharf	(+)	0,24
mittelscharf	0,08	0,13
scharf	0,17	0,10
scharf	0,12	0,05
scharf nach 6 Monaten	--	(+)

(+) nur qualitativ nachweisbar -- negativ

Versuchsanordnung S. 70 und 72

II. Weiterentwicklung bekannter und Ausarbeitung neuer Verfahren zur Bestimmung des Allylsenföls

1. Vergleichende Beurteilung der maßanalytischen Methoden Wöhlers, des DAB VI und der Pharmacopoea Helvetica

a. Unter Verwendung frisch destillierten Allylsenföls

Bei einem Vergleich der drei untersuchten Verfahren weist die Hypojoditmethode nach H. WÖHNER (69) die größte Genauigkeit auf. Sie bietet auch

hinsichtlich des Zeitaufwands gegenüber den beiden Arzneibuchverfahren Vorteile und wird daher bei den weiteren Untersuchungen bevorzugt. Durch die Oxydation des Schwefels bis zum Sulfat ergibt sich im Vergleich zu den beiden anderen Methoden ein kleinerer Umrechnungsfaktor, der einen geringeren methodischen Titrationsfehler bedingt.

Zur Bestimmung des Allylsenföls werden heute hauptsächlich die in der Überschrift genannten Arzneibuchmethoden herangezogen. Daneben gibt H. WOJAHN (69) ein als Hypojoditmethode bezeichnetes Verfahren an. Das Allylsenföl wird zunächst mit Ammoniak in Allylthioharnstoff übergeführt, den man nach WOJAHN im alkalischen Milieu erfaßt (Hypoioditmethode). Bei der Überprüfung des Verfahrens unter Verwendung frisch destillierten Allylsenföls lassen sich in Übereinstimmung mit dem Autor etwa 98-99 % der vorgelegten Mengen ermitteln (Tabelle 5). Die Ergebnisse des gleichfalls jodometrisch, jedoch im sauren pH-Bereich auszuführenden Verfahrens der PHARMACOPOEA HELVETICA V (44), das auf MORVILLEZ und MEESEMAECKER (39) zurückgeht, liegen etwas niedriger, im Mittel bei 97 %. Die argentometrische DAB-Methode nach DIETERICH-GADAMER (11, 17) liefert dagegen etwas zu hohe Werte, da die Umsetzung nicht streng stöchiometrisch verläuft. Die leicht erhöhten Ergebnisse werden in der Literatur als "Überwerte" gekennzeichnet.

b. Unter Verwendung von Reinglycosid und Samen, gleichzeitig Ermittlung der Reaktionsbedingungen einer optimalen Senfölbildung

Der Allylsenfölgelhalt eines Montana-Braunsens wird nach zweistündiger Inkubation bei 20° C, den Bedingungen der oben genannten Methoden, mit 1,06 % ermittelt und wächst bei Steigerung der Inkubationstemperatur bis 60° C auf 1,21 % an. Bei dieser Temperatur genügt eine Inkubationszeit von 15 Minuten, um das gesamte Allylsenföl in Freiheit zu setzen. Es läßt sich dann auch durch Zugabe eines Myrosinasepräparats kein weiteres Ansteigen des Allylsenfölgelhalts erzielen. Die Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 70° C ruft infolge Enzymschädigung ein starkes Absinken des Wertes hervor (Tabelle 6).

Im Kommentar zur PHARMACOPOEA HELVETICA V (44a) wird lediglich darauf hingewiesen, daß eine Erhöhung der Temperatur während der zweistündigen Inkubationszeit zu einer Steigerung des in den Senfsamen abspaltbaren Allylsenföls führt.

Tabelle 5:

Wiedergefundene Mengen Allylsenfö, ermittelt nach verschiedenen
Bestimmungsmethoden

Bestimmungs- methode	vorgelegte Menge Allylsenfö mg	wiedergefundene Menge Allylsenfö	
		mg	%
argento- metrisch nach DAB VI	58,4	59,4	101,7
	61,6	62,1	100,9
	67,8	69,4	102,4
	72,3	73,7	102,0
jodometrisch nach Pharmacopoea Helvetica V	75,6	72,6	96,1
	83,7	81,4	97,3
	91,4	88,1	96,4
	102,9	100,4	97,6
Hypo- jodit- methode nach Wojahn	19,2	18,8	97,8
	21,5	21,2	98,7
	24,6	24,4	99,1
	28,4	28,0	98,6

Versuchsbedingungen: DAB-Methode S.

Verfahren der Pharmacopoea Helvetica S.

Hypoioditmethode nach Wojahn S.

Tabelle 6:

Allylsenfölgelhalt in Montana-Braunsenf ermittelt unter Einhaltung verschiedener Inkubationstemperaturen und -zeiten

	Inkubationstemperaturen			
Inkubationszeit	20° C	40° C	60° C	70° C
	Allylsenfölgelhalt %			
15 Minuten	0,32	0,98	1,24	0,08
2 Stunden	1,06	1,14	1,21	0,12

Versuchsanordnung S. 75

Die Ergebnisse der Allylsenfölsbestimmungen in Braunsensamen hängen in erster Linie von dem Ausmaß der enzymatischen Spaltung des Glycosids ab. Die Art des zur Erfassung des Senföls angewandten Verfahrens ist, wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt werden konnte, von geringerem Einfluß. Enzym und Glycosid befinden sich bekanntlich in verschiedenen Zellen des Samens, so daß die Reaktion erst nach dem Zerkleinern der Samen unter Zutritt von Wasser einsetzt. Ein quantitativer Verlauf der enzymatischen Spaltung ist unter Einhalten einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Zimmertemperatur, wie sie die Verfahren nach dem DAB VI (10), der PHARMACOPOEA HELVETICA V (44) und H. WOJAHN (69) vorschreiben nicht gewährleistet. Eigene Beobachtungen lehren, daß die durch die Vorschriften festgelegten Bedingungen meist nur zu einer ungenügenden Glucosidspaltung führen. Es sei an dieser Stelle auch an den bereits mitgeteilten Befund erinnert, daß sich in einer Speisesensenzubereitung noch nach einiger Zeit eine chromatographisch nachweisbare Menge Sinigrin befinden kann.

Die unter Verwendung von Reinglucosid und eines aus Gelbsenf gewonnenen Enzympräparats erzielten Ergebnisse beweisen, daß bei 60° C eine nahezu quantitative Glycosidspaltung stattfindet. Unter Anwendung der Hypojoditmethode können bis zu 99 % der errechneten Menge des Senföls ermittelt werden (Tabelle 7).

Tabelle 7:

Wiedergefundene Menge Sinigrin, errechnet aus dem ermittelten Senfölan-
anteil nach Sinigrin-Spaltung durch Myrosinase

Probe Nr.	vorgelegte Menge Sinigrin mg	wiedergefundene Menge Sinigrin	
		mg	%
1	98,0	95,55	97,5
2	97,8	95,9	98,0
3	61,6	59,7	96,9
4	97,9	96,6	98,7
5	104,2	103,2	99,1
6	83,6	80,5	96,3
7	73,4	72,3	98,5
8	93,5	92,2	98,6
9	107,4	105,5	98,2
10	112,9	111,9	99,3

Die Erfassung des Allylsenföls erfolgte mit der Hypojodit-Methode. Für die Proben 1 - 5 betrug die Inkubationszeit 2 Stunden bei Zimmertemperatur, während die Ansätze 6 - 10 15 Minuten bei 60° C im Thermostat behandelt wurden.

Die Verwendung einer Citratpufferlösung vom pH-Wert 6,8 gewährleistet eine gleichbleibende Wasserstoffionen-konzentration während des Reaktionsablaufs. Durch die Bildung von Bisulfat bei der Sinigrinspaltung würde der pH-Wert sinken. Bei Gehaltsbestimmungen in Senfsamen wirken diese teilweise selbst als Puffer.

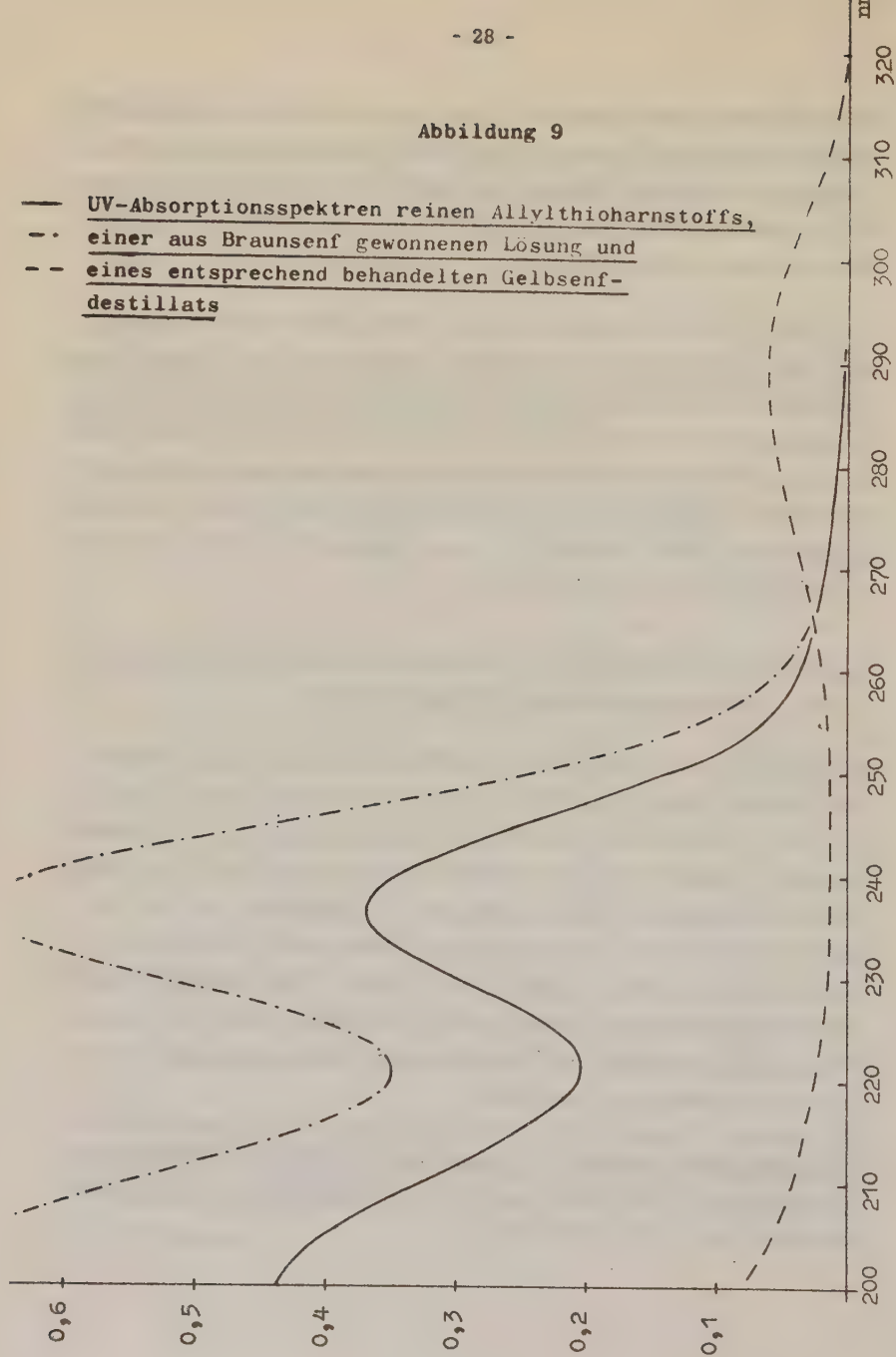
Die Zugabe eines Myrosinasepräparats erzeugt im Versuchsansatz einen Enzymüberschuß, der eine quantitative Spaltung begünstigt. Diese Maßnahme erlangt bei "enzymsschwachen" Braunsensorten besondere Bedeutung. In den meisten Fällen genügt der Enzymgehalt der Samen bei einer Inkubationstemperatur von 60° C zu einer vollständigen Spaltung des Sinigrins. Die zusätzlich beigefügte Myrosinase gleicht jedoch mögliche Enzymschädigungen aus, die das Saatgut z.B. durch nachträgliche Wärmebehandlung feucht geernteter Samen erfahren kann.

2. Quantitative Erfassung des Allylsenföls auf Grund der UV-Absorption des mit Ammoniak gebildeten Allylthioharnstoffs

Die Methode erweist sich als sehr empfindlich und gestattet die Bestimmung kleiner Mengen in der Größenordnung von 0,1 bis 1 mg Allylsenföl in 100 ml Wasser entsprechend etwa 0,4 bis 4 mg Sinigrin. Es ist jedoch zweckmäßig, größere Mengen in Ansatz zu bringen und erst vor der spektralphotometrischen Messung entsprechend zu verdünnen. Mit dem Verfahren lassen sich 98 - 99 % vorgelegter Einwaagen an Allylsenföl ermitteln. Ähnlich günstige Werte ergeben sich bei Allylsenfölbestimmungen aus Sinigrin, das durch Einwirkung von Myrosinase in das Senföl übergeführt und nach Auffangen des Destillats in einer ammoniakhaltigen Vorlage als Allylthioharnstoff erfaßt wird.

Allylthioharnstoff weist bei 237 nm ein charakteristisches Absorptionsmaximum auf, das von KJAER, CONTI und LARSEN (32) bei 243 nm beschrieben wird (Diskussion S. 60).

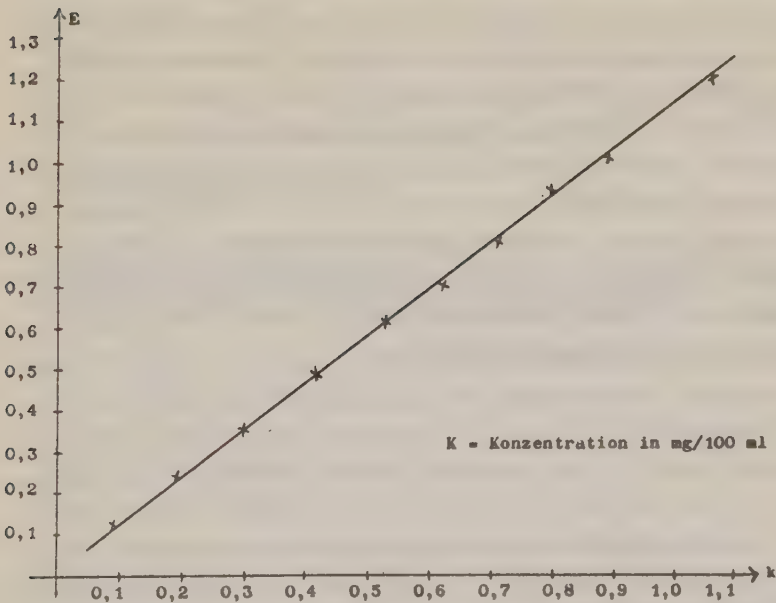
Abbildung 9



Im Konzentrationsbereich von 0,1 - 1 mg/100 ml Wasser ist die Extinktion im Absorptionsmaximum bei 237 nm der vorgelegten Konzentration proportional. Bei der Aufzeichnung der Eichkurve ergibt sich eine Gerade. Damit ist die Bedingung des LAMBERT-BEER'schen Gesetzes erfüllt und die Voraussetzung einer quantitativen Bestimmung auf Grund von Extinktionsmessungen gegeben.

Abbildung 10

Eichkurve zur Bestimmung des Allylthioharnstoffs ermittelt bei 237 nm



3. Vergleich der Ergebnisse der Allylsenfölbestimmungen in den Samen des braunen Senfs mittels einer variierten Hypojodit-Methode und des spektralphotometrischen Verfahrens

Die beiden Methoden lassen sich nebeneinander unter Verwendung des gleichen Ansatzes durchführen und gestatten daher einen unmittelbaren Vergleich der Ergebnisse. Geht man von 5 g Samen aus, so genügt 1 ml der nach dem Vertreiben des Alkohols und des Ammoniaks auf 100 ml aufgefüllten allylthioharnstoffhaltigen Lösung in einer Verdünnung von 1:100 in Wasser zur Durchführung der spektralphotometrischen Bestimmung. Mit je 25 ml der Stammlösung können außerdem noch drei Bestimmungen mit Hilfe der Hypojodit-Methode durchgeführt werden. Bei verschiedenen Braunsensorten sind die Ergebnisse der Hypojodit-Methode um 2 - 4 % höher als diejenigen des spektralphotometrischen Verfahrens. Der Fehler liegt offenbar bei der Hypojodit-Methode, die außer Allylthioharnstoff auch andere bei der Destillation übergehende, reduzierend wirkende Stoffe erfaßt. Das UV-Spektrum der aus dem Braunsensdestillat gewonnenen allylthioharnstoffhaltigen Lösung ist durch keinerlei Störabsorption gekennzeichnet (Abb. 9). Im einzelnen gelangten verschiedene Sorten von türkischem, dänischem, Bari- und Montanabraunsenf zur Untersuchung. Der Gehalt an Allylsenföl schwankt zwischen 0,58 und 1,24 %, entsprechend 2,34 - 4,92 % Sinigrin (Tabelle 8).

Tabelle 8:

Allylsenfö- bzw. Sinigringehalte verschiedener Braunsenf Samen

Braunsenf	Bestimmungsmethode			
	Hypoioditmethode		spektralphotometrisch	
	Allylsenfö %	Sinigrin %	Allylsenfö %	Sinigrin %
Montana I	0, 63	2, 50	0, 02	2, 46
Montana II	1, 24	4, 92	1, 20	4, 76
türkischer	1, 19	4, 72	1, 14	4, 53
dänischer I	0, 61	2, 42	0, 59	2, 34
dänischer II	1, 01	4, 01	0, 98	3, 89
Bari	0, 83	3, 26	0, 80	3, 18

Versuchsbedingungen S. 75 und 77

4. Allylsenfö- und Sinigringehalte in Speisesenfproben verschiedener Herkunft ermittelt mit Hilfe der erarbeiteten Methoden

Der Einfluß des Gelbsenfs auf die Bestimmungsmethoden des Allylsenföls erlangt bei Gehaltsbestimmungen in Speisesenf besondere Bedeutung, da zu dessen Zubereitung neben Braunsenf je nach Art der Geschmacksrichtung wechselnde Mengen Gelbsaat Verwendung finden. Die enzymatische Spaltung des im Gelbsenf enthaltenen Sinalbins durch die den Samen eigene Myrosinase ergibt in unvollständig verlaufender Reaktion Glucose, Sinapinbisulfat und das mit Wasserdampf nicht flüchtige, unbeständige p-Hydroxybenzylsenfö. Trotzdem kann man mit der Hypoiodit-Methode bei Anwendung eines aus Gelbsaat gewonnenen Destillats einen Jodverbrauch beobachten, der bei den untersuchten Gelbsenfsamen unter den

Versuchsbedingungen 0,1 bis 0,2 ml beträgt. Es wird damit ein Allylsenf-ölgehalt von 0,5 - 1 mg (0,01 - 0,02 %) entsprechend einer scheinbaren Verfälschung mit 1 - 3 % Braunsenf vorgetäuscht, wenn man im Braunsenf einen Allylsenfölggehalt von 0,5 - 1,5 % in Rechnung stellt.

Die spektralphotometrische Bestimmung des Allylsenföls wird durch die Anwesenheit von Gelbsenf nur wenig gestört. Die entsprechend angelegte Untersuchung eines Gelbsenfansatzes ergibt eine geringe, sich über den ganzen UV-Bereich erstreckende Absorption ohne spezifisches Maximum (Abb. 9). Unterläßt man die Verdünnung der Stammlösung (Experimenteller Teil S. 77), so kann die durch den Gelbsenf verursachte Störabsorption hundertfach vergrößert und der Fehler genauer abgeschätzt werden. Die Extinktion im Meßbereich bei 237 nm beträgt dann bei den verschiedenen Gelbsenfproben 0,4 - 0,6. Bei der für die Allylsenfölbestimmung in Samen erforderlichen Verdünnung verringert sich diese Extinktion auf 0,004 - 0,006 und liegt damit etwa im Grenzbereich der Meßgenauigkeit des Geräts. Bei der Erfassung geringer Mengen Allylsenföls in Speisesenf fällt dieser Betrag jedoch ins Gewicht, da das Destillat in diesen Fällen nicht verdünnt werden kann. Der absolute Fehler bleibt zwar klein, aber solche Bestimmungen sind dann mit einem größeren relativen Fehler behaftet, der sich allerdings auch durch die Anwendung maßanalytischer Methoden nicht vermeiden läßt.

Tabelle 9:

Allylsenfö- und Restsinigringehalt verschiedener Speisesenfproben

Senfart	Allylsenfö-			Restsinigrin		
	frisch %	nach 3 Monaten %	nach 6 Monaten %	frisch %	nach 3 Monaten %	nach 6 Monaten %
mittelscharf 1	0,05	0,03	(+)	0,028	-	-
scharf 1	0,28	0,14	0,06	0,15	(+)	-
scharf 2	0,15			0,17		
mild	0,005	-	-	-	-	-
mittelscharf	Herstellungsdatum unbekannt					
Nr. 2	0,08			(+)		
Nr. 3	0,06			(+)		
Nr. 4	0,03			-		
Nr. 5	(+)			-		

(+) = schwach positiv

- = negativ

Die Restsinigrinbestimmung erfolgte nach Zufügen eines
Myrosinasepräparats

Versuchsanordnung S. 76 und 77

III. Erarbeitung einer Bestimmungsmethode des Sinalbins auf der Grundlage der enzymatischen Spaltung des Glucosids unter Rhodanidbildung - Rhodanid-Methode

1. Nachweis des in Sinalbinlösungen durch Myrosinase und in Gelbsenfansätzen entstehenden Rhodanids mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

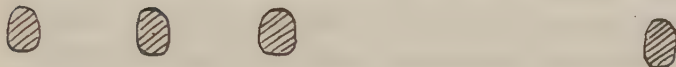
Führt man die enzymatische Spaltung des Sinalbins mit Myrosinase unter Zusatz einer Citratpufferlösung vom pH-Wert 6,8 im nahezu neutralen pH-Bereich durch, so erfährt das Glucosid eine besondere Art der Umsetzung. Im Substrat kann dünnschichtchromatographisch Rhodanid nachgewiesen werden (Abb. 11), während bei der organoleptischen Prüfung des Ansatzes kein Senföl zu erkennen ist. Gleichartige Versuche unter Verwendung von Sinigrin sowie Montana- und Baribraunsensamen ergeben keine Rhodanidreaktion.

Bei der Spaltung des Sinalbins im sauren Milieu (Essigsäure pH 3 - 4) konnte erneut festgestellt werden, daß die Reaktion unter Bildung des p-Hydroxybenzylsenföls nicht quantitativ verläuft. Im Substrat der Glucosid- und Gelbsenfansätze läßt sich dünnschichtchromatographisch deutlich Sinalbin nachweisen. Unterläßt man den Zusatz der Essigsäure, so zeigen die entsprechenden Proben ein ähnliches Verhalten. In den Glucosidansätzen sinkt der pH-Wert von 5,5 zu Beginn der Reaktion auf 2,7 nach 24 Stunden. Bei diesen Bedingungen unterbleibt die Rhodanidbildung. Die anfangs saure Reaktion geht auf die Myrosinaselösung zurück.

Die Ursache des pH-Abfalls, den auch HALBACH (20) beobachtet, liegt in dem mit fortschreitender enzymatischer Spaltung entstehenden Bisulfat begründet. Nach KJAER (35) ist das p-Hydroxybenzylsenföl nur in ätherischer Lösung beständig. Beim Versuch das Senföl zu isolieren tritt sofort Zersetzung ein. In wässriger Lösung soll es nach PRITZKER und JUNGKUNZ (45) Umlagerungen erleiden. Bereits bei gewöhnlicher Temperatur neigt das p-Hydroxybenzylsenföl zur Oxydation und Polymerisation. Da es außerdem im Gegensatz zu fast allen anderen Senfölen mit Wasserdampf nicht flüchtig ist und sich beim Erhitzen zersetzt, scheint eine Sinalbinbestimmung über das p-Hydroxybenzylsenföl nicht durchführbar.

Abbildung 11

Dünnschichtchromatographischer Nachweis des Rhodanids in Glycosid- und Senfansätzen



- | | |
|---------------------|----------------------|
| 1. KSCN | 5. Sinigrin + Enzym |
| 2. Sinalbin + Enzym | 6. Sinapin-Rhodanid |
| 3. Gelbsenf | 7. Montana-Braunsenf |
| 4. Bari-Braunsenf | |

Versuchsordnung S. 75

2. Entwicklung einer Bestimmungsmethode für das enzymatisch aus Sinabin gebildete Rhodanid

Der Nachweis des Rhodanids mit Eisen-(III)-chlorid ist nicht spezifisch, da auch das Sinapin eine rotbraune Farbe erzeugen kann. Außerdem muß man bei der Untersuchung von Senfsamen mit der Anwesenheit anderer Verbindungen rechnen, die infolge phenolischer OH-Gruppen mit Ferri-chlorid eine Färbung ergeben. Für die Rhodanidbestimmung wird daher die Brom-Pyridin-Benzidin-Methode nach ALDRIDGE (1) in der verfeinerten Form von STOA (58) herangezogen und auf vorliegende besondere Erfordernisse abgestimmt. Bei der Durchführung der Farbreaktion sind die Flüssigkeitsmengen so bemessen, daß es möglich ist, die Umsetzung in Reagenzgläsern vorzunehmen (Versuchsteil S. 78).

Thiocyanat ruft nach Zusatz von Bromwasser und nachfolgender Beseitigung des Bromüberschusses durch Kaliumarsenitlösung mit einem Reagenzgemisch bestehend aus Pyridin, Benzidinhydrochlorid und Salzsäure eine rotviolette Färbung hervor, die sich spektralphotometrisch auswerten läßt. Der Farbstoff ist nicht stabil. Nach Angaben der genannten Autoren soll man in einem Zeitraum von 24 ± 3 Minuten bei 510 nm ablesen.

Eigene Untersuchungen unter Verwendung von KSCN bestätigen die Proportionalität der gemessenen Extinktionen zu den vorgelegten Konzentrationen in einem Bereich bis zu 1, 2 mg% KSCN. Dies gilt auch unter veränderten Versuchsbedingungen wie z.B. einer geringen Verschiebung der Wellenlänge bei der Messung. So läßt sich die Bestimmung auch bei der Hg-Linie 492 nm durchführen. - Das Absorptionsspektrum erfährt in Abhängigkeit von der Zeit eine langsame Verschiebung in Richtung einer größeren Wellenlänge, die zunächst von einer geringen Zunahme der Extinktion im Absorptionsmaximum begleitet wird. Die Festlegung der Meßzeit auf einheitlich 25 Minuten nach Reaktionsbeginn ermöglicht genauere Ergebnisse gegenüber der ursprünglichen Anordnung nach STOA (58). Das Absorptionsmaximum liegt dann bei 518 nm (Abb. 12). Für die Messung bei der Hg-Linie von 492 nm empfiehlt sich die Einhaltung einer Reaktionszeit von 20 Minuten, da unter diesen Bedingungen die Absorption das Maximum bei 510 nm erreicht.

Absorptionsspektrum des aus KSCN mit dem Benzidin-Pyridin-Reagenz gebildeten Farbstoffs nach 20 Minuten

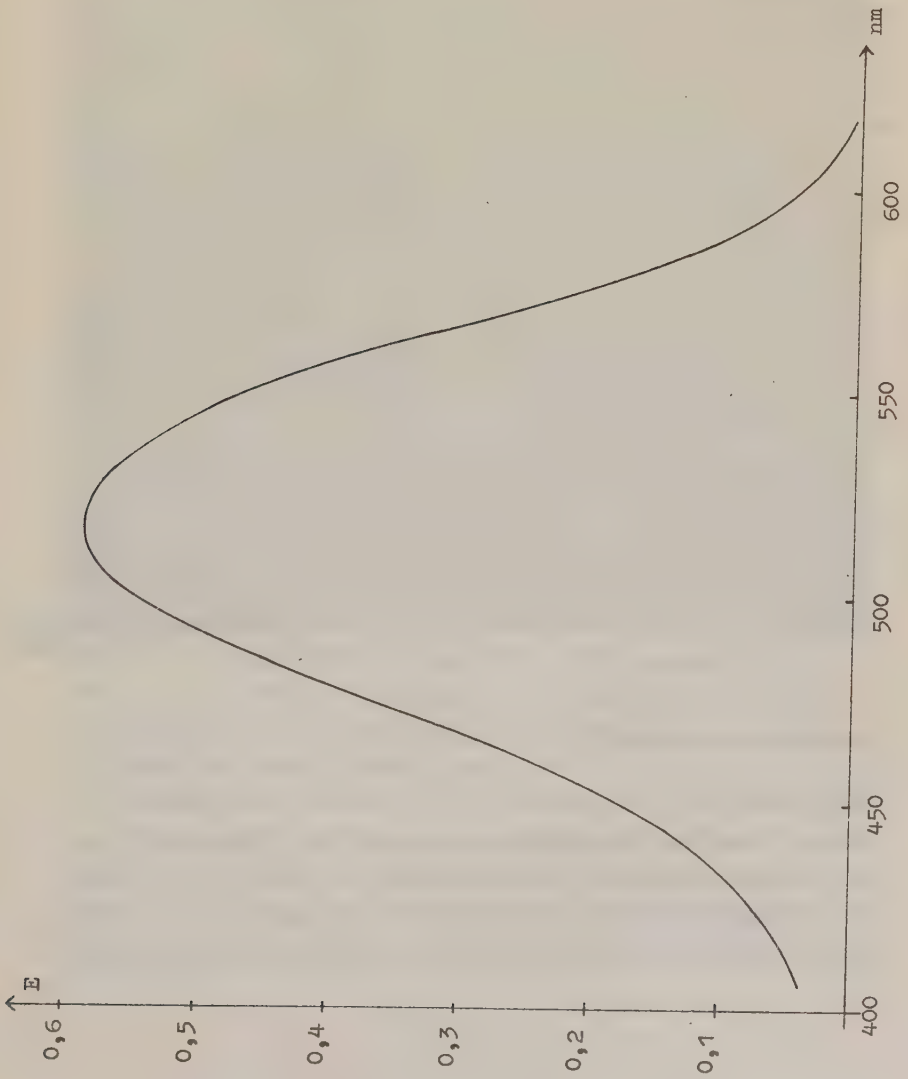
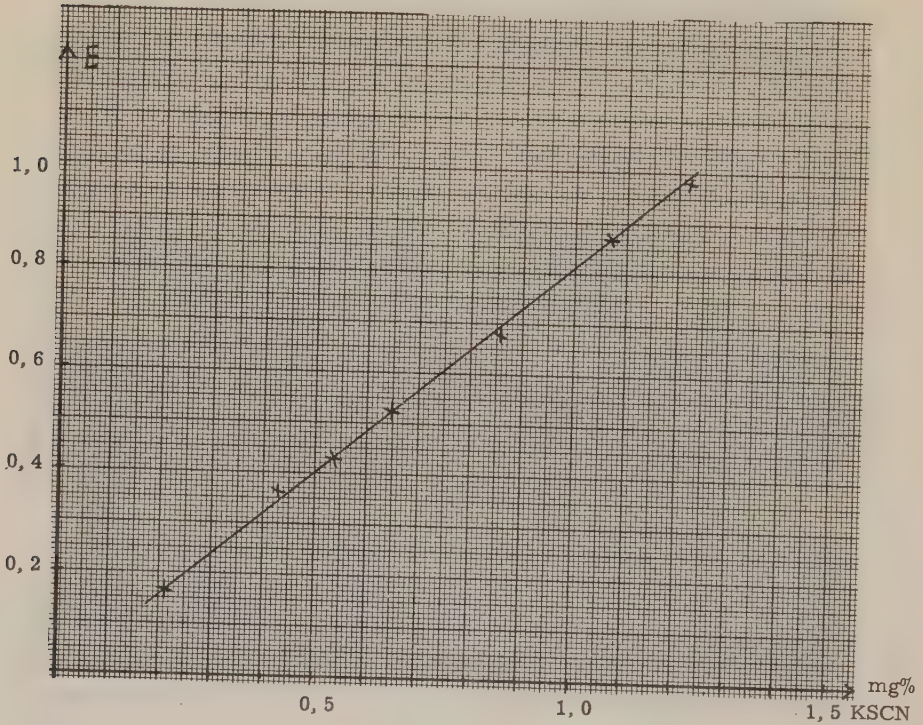


Abbildung 13

Eichgerade zur Bestimmung von Rhodanid mit Hilfe der Brom-Pyridin-Benzidin-Methode



Versuchsbedingungen S. 78

Im Vergleich zur "Ferri-Methode" ist die "Brom-Pyridin-Benzidin-Methode" wesentlich empfindlicher und gestattet die Erfassung sehr kleiner Mengen Rhodanids in der Größenordnung von 1 mg%, wie sie in Senf-ansätzen zu erwarten sind. Es treten jedoch in einigen Fällen vermeidbare Störungen auf, die zu einer wesentlichen Verminderung der Extinktion und

damit zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Beim Zufügen der ersten Tropfen des Pyridin-Benzidin-Reagenzes tritt gelegentlich eine blaugrüne Farbe auf. Im Extremfall kann sogar ein blaugrüner Niederschlag ausfallen. Mehrere Ursachen tragen zu dieser unerwünschten Reaktion bei.

Als in einem Versuchsansatz versehentlich die Beseitigung des Bromüberschusses mit Kaliumarsenit unterlassen wurde, ließ sich eine Möglichkeit der Störung des Reaktionsablaufs besonders deutlich beobachten, da große Mengen eines blaugrünen Niederschlags ausfielen, und die Bildung des rot-violetten Farbstoffs ausblieb. Weitere Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, daß Bromspuren an den Wänden des Reaktionsgefäßes, die unter Umständen von der Kaliumarsenitlösung nicht erfaßt werden, die Störung hervorrufen können. Eine andere Ursache für die abweichende Reaktion liegt in der Oxydationsempfindlichkeit des Pyridin-Benzidin-Reagenzes begründet. Besonders bei Reihenuntersuchungen zeigte sich eine zunächst unerklärlich hohe Zahl von "Ausreißern", deren Extinktion erheblich zurückblieb. Bei diesen Versuchen erfolgte die Zugabe des Pyridin-Benzidin-Reagenzes jeweils im Abstand von einigen Minuten mit der gleichen Pipette, die in der Zwischenzeit an der Luft lag. Beim genauen Betrachten der Pipette fiel auf, daß sich besonders unten am äußeren Ausflußrand, aber auch im Innenraum am unteren Teil ein feiner, blauschwarzer Überzug bildete, der beim Zufließen des Reagenzes in die Meßlösung geschwemmt wird und die Störung verursacht.

3. Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen für die Spaltung des Sinalbins unter Rhodanidbildung

a. Der Einfluß des pH-Werts auf den Ablauf der enzymatischen Spaltung

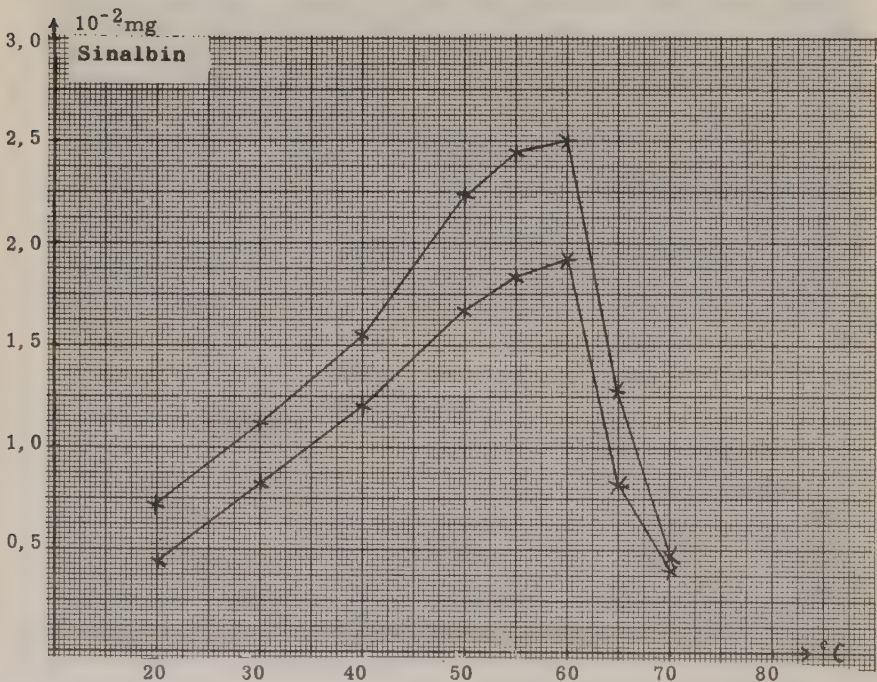
Wie die Versuchsergebnisse lehren, bildet sich bei einem pH-Intervall von 6,5 bis 7,0 Rhodanid in quantitativer Ausbeute. Im sauren Milieu entsteht p-Hydroxybenzylsenfö, während im alkalischen die Aktivität der Myrosinase offenbar gehemmt wird.

b. Ermittlung des Temperaturoptimums der enzymatischen
Rhodanidbildung

Die enzymatische Spaltung erfolgte optimal bei Temperaturen zwischen 55 und 60 °C in einer Citratpufferlösung vom pH-Wert 6,8. Bei Vorlage einer bestimmten Menge Sinalbins wurde die Enzymmenge so bemessen, daß eine vollständige Umsetzung bei optimalen Reaktionsbedingungen gerade noch unterblieb. Die aus Gelbsenfsamen gewonnene Myrosinaselösung mußte auf 1:500 verdünnt werden, da bei höheren Konzentrationen sich bereits bei Zimmertemperatur bis zu 97 % des Sinalbins in Rhodanid umlagerten.

Abbildung 14

Temperaturoptimum der Spaltung des Sinalbins unter Rhodanidbildung



Sinalbinvorlage: Obere Kurve: $9,52 \times 10^{-2}$ mg, untere: $4,76 \times 10^{-2}$ mg

4. Erprobung der Rhodanid-Methode an Reinglucosid

Das Verfahren zur Bestimmung des Sinalbins auf der Grundlage der enzymatischen Rhodanidbildung, sei es in Glucosidlösungen, Gelbsaat oder Speisesenf, wird im folgenden als Rhodanid-Methode bezeichnet. Bei der Vorlage von Sinalbin lassen sich nach enzymatischer Spaltung in einer Citratpufferlösung vom pH-Wert 6,8 bei 55 - 60° C 92 bis 97 % des Glucosids ermitteln (Tabelle 10).

Tabelle 10:

Ergebnisse der Sinalbinbestimmungen mittels der Rhodanid-Methode

vorgelegte Menge Sinalbin 10 ⁻² mg	wiedergefundene Menge Sinalbin	
	10 ⁻² mg	%
2,38	2,19	92,0
4,76	4,44	93,2
7,14	6,93	97,1
9,52	9,10	95,6
11,90	11,29	94,9

Die einzelnen Ergebnisse stellen den Mittelwert aus 10 Bestimmungen dar.

Versuchsanordnung S. 79

5. Sinalbingehalte von Gelbsenfsamen unterschiedlicher Herkunft ermittelt mit Hilfe der erarbeiteten Methode

Die Ermittlung des Sinalbingehalts verschiedener Gelbsaaten ergab Werte zwischen 2,27 und 4,56 %. Die Ergebnisse sind auf die wasserhaltigen Samen bezogen. Bei der Durchführung der Bestimmung empfiehlt sich

die Verwendung entfetteter, lufttrockener und staubfein zermahlener Pulver, da sich infolge des hohen Fettgehalts der Samen eine störende emulsionsartige Trübung ausbilden kann.

Tabelle 11:

Sinalbingehalte einiger Gelbsenfsamen

Herkunft	Sinalbingehalt %
französischer 1	2, 27
französischer 2	4, 56
deutscher 1	2, 86
deutscher 2	3, 61

Versuchsanordnung S. 80

6. Sinalbingehalte in Speisesenfproben - Verhalten des p-Hydroxybenzylsenföls bei Anwendung der Rhodanid-Methode

Der Glucosidgehalt schwankt je nach Art und Alter des Speisesenfs. Milde und mittelscharfe Sorten enthalten einen größeren Gelbsenfanteil und dadurch auch einen höheren Sinalbingehalt als scharfer Speisesenf. Für die Untersuchungen standen zum Teil Industrieproben zur Verfügung, deren Herstellungsdatum genau bekannt war. Die Gehaltsbestimmungen wurden in einem Zeitraum von 5 - 10 Tagen nach der Zubereitung vorgenommen.

Tabelle 12:

Restsinalbingehalte verschiedener Speisesenfproben

Senfart	Sinalbingehalte	
	Probe 1 %	Probe 2 %
mild	0, 21	0, 17
mittelscharf	0, 18	0, 14
scharf	0, 08	0, 10

Versuchsbedingungen S. 80

Für die Erfassung des Restsinalbins in Speisesenf resultiert unter Berücksichtigung nachstehend beschriebener Erkenntnisse folgende Verfahren:

- 1) Bestimmung des Gesamtrhodanids nach Zufügen eines Myrosinasepräparats und einer Citratpufferlösung vom pH-Wert 6,8 (vgl. Experimenteller Teil S.80 , Hauptversuch).
- 2) Bestimmung des bereits vorhandenen und des durch teilweise Umlagerung des im Speisesenf enthaltenen p-Hydroxybenzylsenföls entstehenden Rhodanids - Vergleichsprobe (Experimenteller Teil S.80).

Der Sinalbingehalt läßt sich aus der Differenz der beiden Rhodanidwerte berechnen (1. - 2.).

Folgende Befunde führten zu dieser Verfahrensweise:

Speisesenf enthält bereits einen bestimmten Rhodanidgehalt, der bei den untersuchten Proben 3 - 5 mg% betrug. Nach inaktivieren der Myrosinase und anschließendem Neutralisieren erhöht sich der Rhodanidanteil auf etwa 5 - 8 mg%. Diese Erscheinung läßt sich mit dem teilweisen Zerfall des im Speisesenf enthaltenen p-Hydroxybenzylsenföls erklären. Bei

einem quantitativen Reaktionsverlauf müßten die Rhodanidwerte wesentlich höher liegen.

Bei der enzymatischen Rhodanidbildung aus Sinalbin kann als Zwischenprodukt ebenfalls als p-Hydroxybenzylsenföl angenommen werden, das bei neutralem pH-Wert sofort in Rhodanid zerfällt. Im Speisesenf wird bei dem durch die Anwesenheit der Essigsäure bedingten pH-Wert von 3 - 4 die Umlagerung des p-Hydroxybenzylsenföls unter Rhodanidbildung verhindert. Auf Grund seiner chemischen Eigenschaften - Neigung zu Umlagerungs- und Polymerisationsreaktionen - dürfte das im Speisesenf bereits vorhandene p-Hydroxybenzylsenföl nicht mehr in der ursprünglich entstehenden Form vorliegen und daher auch nicht mehr in der Lage sein, beim Neutralisieren des Ansatzes unter Rhodanidbildung zu reagieren, zumindest nicht in quantitativem Ausmaß (Diskussion S. 63 - 66).

Da das p-Hydroxybenzylsenföl in reiner Form bisher nicht isoliert werden konnte, besteht keine Möglichkeit, die Reaktion der Verbindung vor allem in wässriger Lösung zu prüfen. HALBACH (20) erhielt beim Versuch das Senföl als Spaltprodukt des Sinalbins zu gewinnen ein harzartiges Produkt in unbefriedigender Ausbeute, das allerdings einen sehr scharfen Geschmack aufwies.

IV. Unterscheidung von Gelb- und Braunsenf mit Hilfe der Eisen-(III)-chlorid-Reaktion

1. Verhalten der Samen und der Reinglucoside

Versetzt man 1 g der zermahlenen Samen mit etwa 10 ml destillierten Wassers und läßt 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen, so zeigen die Filtrate des Gelb- und Braunsens mit salzsaurer Eisen-(III)-chloridlösung eine unterschiedliche Reaktion: Das Filtrat der Gelbsensamen weist eine intensiv rote Farbe auf, während der Braunsenf nur eine dunkelrot-bräunliche Färbung hervorruft, die im Farbton und vor allem in der Farbintensität wesentlich schwächer ausgeprägt ist. Reine Glucosidlösungen

reagieren mit Eisen-(III)-chlorid überhaupt nicht. Erst nach Zufügen von Myrosinase tritt beim Sinalbin eine rote Färbung auf, die sich auch im essigsauren Ansatz beobachten läßt. Die Reaktion muß in erster Linie auf das Entstehen des p-Hydroxybenzylsenföls und letzten Endes auf eine Phenol-Eisen-(III)-chlorid-Reaktion zurückgeführt werden. Daneben kommen als Reaktionspartner im Falle des Gelbsenfs geringe Mengen Rhodanids in Frage, da die Reaktion mit dem Brom-Pyridin-Benzidin-Reagenz schwach positiv verläuft. Die Reaktion des Sinapins das ebenfalls eine phenolische OH-Gruppe aufweist und auch im Braunsenf enthalten ist, führt zu keiner auffallenden Störung. Wahrscheinlich sind auch andere phenolartige Verbindungen für die schwache Färbung des Braunsenfs verantwortlich zu machen.

Die Reaktion mit Eisen-(III)-chlorid kann zu einer qualitativen Unterscheidung der beiden Senfsaaten herangezogen werden. Interessant ist vor allem eine Verfälschung der Braunsenfsamen mit Gelbsaat, die zum Beispiel in Senfpulver vorkommen kann. So lassen sich schon etwa 5 % Gelbsenfsamen in einem Braunsenfpulver auf Grund der gegenüber reinem Braunsenf wesentlich stärker ausgeprägten FeCl_3 -Reaktion erkennen.

2. Nachweis von Gelbsenf in Speisesenfproben

Die oben beschriebene Reaktion läßt sich auch zum qualitativen Nachweis von Gelbsenfanteilen im Speisesenf heranziehen. In der Regel wird Speisesenf unter Verwendung von Gelb- und Braunsenf zubereitet. Hier kann man nach Aufschwemmen in Wasser im Filtrat mit Eisen-(III)-chlorid eine deutliche Rotfärbung beobachten. Bei Speisesenforten, die sich durch einen besonders scharfen Geschmack auszeichnen, greift man jedoch zum Teil nur auf reinen Braunsenf zurück. Eine derartige industriell hergestellte Probe zeigte die für diese Samenart charakteristische nur schwach ausgeprägte Reaktion mit Eisen-(III)-chlorid, die sich auch nach einigen Wochen oder Monaten nicht verstärkte.

V. Untersuchungen über den bitteren Geschmack des Senfs

1. Beschreibung des Phänomens "bitterer Geschmack" in Speisesenf

Das Auftreten eines bitteren Geschmacks in Senfzubereitungen beschränkt sich auf wenige Ausnahmefälle und äußert sich in zwei Erscheinungsformen:

a. Vorübergehende Bitterkeit

Sie kann kurz nach Herstellung des Speisesenfs beobachtet werden. Das bittere Geschmacksempfinden ist von der scharfen Komponente der Senföle überdeckt und läßt sich als bitterer Nachgeschmack nach etwa 5 - 10 Sekunden am hinteren Teil der Zunge und des Gaumens wahrnehmen. Der bittere Geschmack geht meistens innerhalb weniger Tage, manchmal auch erst nach etwa 3 Wochen zurück, bis schließlich ein normaler, würzig-aromatischer Speisesenf resultiert.

b. Bleibende Bitterkeit

Sie tritt nur sehr selten auf und konnte in den zur Verfügung stehenden Proben nicht beobachtet werden. Die Angaben stützen sich auf die Beschreibung der Senfhersteller, wonach ein sich bereits im Handel befindlicher Speisesenf einige Wochen nach der Zubereitung plötzlich intensiv bitter wurde und aus dem Verkehr gezogen werden mußte. Andererseits kann die unter a. beschriebene vorübergehende Bitterkeit längere Zeit andauern und im Extremfall ganz erhalten bleiben.

2. Befunde organoleptischer Untersuchungen an Speisesenfproben, Senfsamen, Glucosiden und Sinapinrhodanid

a. Speisesenf industrieller Herkunft

Im allgemeinen läßt sich in einem ausgereiften Speisesenf kein bitterer Geschmack feststellen. Nur in zwei verschiedenen Proben, deren Zusammensetzung und Herstellungsdatum bekannt waren, konnte eine vorüber-

gehende Bitterkeit beobachtet werden. Sie wurden etwa 5 Tage nach der Zubereitung untersucht. Die beiden Erzeugnisse, das eine ausschließlich, das andere überwiegend aus Braunsenf hergestellt, waren durch einen sehr scharfen Geschmack gekennzeichnet. Im reinen Braunsenf ging der anfangs deutlich ausgeprägte bittere Geschmack innerhalb von 3 - 4 Wochen allmählich zurück. Es resultierte ein voll genußfähiger, sehr scharfer Speisesenf. Ähnlich, wenn auch in geringerem Maße ausgeprägt, lagen die Verhältnisse bei der zweiten Probe. Hierbei ist zu betonen, daß der Senf bereits zu Beginn der Untersuchung ein wohlschmeckendes Erzeugnis lediglich mit etwas bitterem Nachgeschmack darstellte, den ein Teil der unvoreingenommenen Prüfer nicht erkennen konnte.

b. Gelb- und Braunsensamen

Die in einem Starmix fein zerschlagenen Samen weisen einen deutlich bitteren Geschmack auf, der beim Braunsenf besonders stark hervortritt. Beim Gelbsenf kommt noch eine adstringierende Komponente hinzu, die den bitteren Geschmack in milderer Form erscheinen läßt. Da die störenden Senföle erst durch die enzymatische Spaltung der entsprechenden Glucoside entstehen, wird die Wahrnehmung des bitteren Geschmacks zunächst nicht beeinträchtigt, dann aber nach einigen Sekunden von dem scharfen Geschmack der Senföle überlagert.

c. Die Senfölglycoside Sinigrin und Sinalbin

Sinigrin ruft einen intensiv bitteren Geschmack hervor, der in einer wässrigen Lösung noch in einer Verdünnung von der Größenordnung 1 : 10 000 wahrnehmbar ist. Sinalbin ist ebenfalls bitter. Der kritische Konzentrationsbereich kann wegen der weit geringeren Löslichkeit der Verbindung nicht genau festgelegt werden, liegt jedoch um etwa eine Zehnerpotenz höher als beim Sinigrin. Außerdem tritt beim Sinalbin eine mehr adstringierende Wirkung in den Vordergrund.

d. Sinapinrhodanid

Die Verbindung wirkt vor allem adstringierend. Nach eigenem Empfinden und von der Mehrzahl einer Reihe von Testpersonen bestätigt, sind auch dem Sinapinrhodanid bittere Eigenschaften zuzuschreiben. Einige Prüfer konnten jedoch keinen bitteren Geschmack wahrnehmen.

Mehrere Autoren charakterisieren die Sinapinverbindungen als Bitterstoffe. So berichtet SCHWARZE (57) vom Sinapin als "Bitterstoff der Rapssamen". Nach SCHULTZ und GMELIN (53) "zeichnet sich Sinapin durch einen sehr bitteren Geschmack aus". ANDRE und CARBOUERE (2) ordnen den bitteren Geschmack der Ölkuchen des Rapses und des Gelbsenfs den Senfölglicosiden zu, da nach behandeln im strömenden Wasserdampf der bittere Geschmack verschwindet, und im Falle des Rapses der S-Verlust genau dem vorher ermittelten Crotonylsenfölaneil entspricht.

3. Abnahme des bitteren Geschmacks in Abhängigkeit vom Umfang der Glucosidspaltung

a. Beobachtungen an Reinglucosiden

Eine wässrige Sinigrinlösung verliert nach Zufügen eines Myrosinasepräparats mit fortschreitender enzymatischer Spaltung ihren bitteren Geschmack. Diese Erscheinung läßt sich sowohl in einer Citratpufferlösung vom pH-Wert 6,8 als auch in essigsaurer Lösung bei pH 3,5 - 4,0, den pH-Verhältnissen im Speisesenf, beobachten.

Entsprechende Sinalbinlösungen weisen von vorneherein einen weit schwächer ausgeprägten bitteren Charakter auf. Daneben tritt die adstringierende Wirkung in den Vordergrund. Obwohl die enzymatische Spaltung trotz eines großen Überschusses an Myrosinase im sauren Bereich unter Bildung des p-Hydroxybenzylsenföls nicht vollständig verläuft - im Substrat konnte dünn-schichtchromatographisch Sinalbin nachgewiesen werden - läßt sich auch hier eine Abnahme des bitteren Geschmacks erkennen. Im neutralen Bereich entsteht im Unterschied zum Sinigrin kein Senföl, sondern Rhodanid (Rhodanid-Methode). Bei diesen Ansätzen läßt sich eine leichte Verstärkung des bitteren Geschmacks beobachten.

b. Beobachtungen an selbst hergestellten Speisesenfproben

Tabelle 13:

Abnahme des bitteren Geschmacks in Ansätzen aus türkischem Braunsenf
in Abhängigkeit von der Sinigrinspaltung

Die Zahlenangaben beziehen sich auf die angewandten Samen

Alter des Ansatzes Tage	Allylsenfölg- gehalt %	Restsinigrin- gehalt %	organoleptische Eigen- schaften des Ansatzes
1	1,05	0,57	sehr scharf, stark bitter
2	1,06	0,52	keine Änderung
3	1,07	0,48	keine Änderung
5	1,05	0,43	leichte Abschwächung der Bitterkeit
8	0,98	0,32	weiteres Nachlassen des bitteren Geschmacks
11	0,93	0,27	obige Tendenz setzt sich fort
14	0,86	0,21	↓
17	0,82	0,14	
20	0,80	0,08	nur noch ganz schwach bitter
24	0,77	---	sehr scharf, kein bitterer Nachgeschmack

Allylsenfölggehalt der Samen bei Spaltung unter optimalen Bedingungen:
1,19 % entsprechend 4,72 % Sinigrin

Versuchsbedingungen zu Tabelle 13:

Gewinnung der Versuchsansätze: Aus 5 g Samen entsprechend S. 76

Gehaltsbestimmungen: Aus dem vollständigen Ansatz entsprechend
der Hypojodit-Methode S. 76 , 4b. und 4c.

Die Versuchsansätze zeigten eine Abnahme des bitteren Geschmacks mit fortschreitender Glucosidspaltung. Die Erscheinung läßt sich beim Braunsenf besonders deutlich beobachten. Innerhalb von zwei bis drei Tagen geht der bittere Geschmack normalerweise völlig zurück. Einige Braunsensorten zeichneten sich jedoch durch eine länger anhaltende Bitterkeit aus. In derartigen Proben von türkischem, dänischem und Baribraunsenf wurde das organoleptische Verhalten der verschiedenen Ansätze in Abhängigkeit vom Ausmaß der Glucosidspaltung über einen längeren Zeitraum verfolgt. Hierbei ergab sich, daß die Abnahme des bitteren Geschmacks vom Abbau des zunächst verbleibenden Restsinigrins begleitet wird. Die Ursache des bitteren Geschmacks ist also in diesen Fällen auf das Sinigrin zurückzuführen, das erst in einem längeren Zeitraum vollständig gespalten wird.

Die Untersuchungen zeitigen nebenher ein bemerkenswertes Ergebnis: Der maximale Senfölgelhalt der Samen teilt sich dem Speisesenfansatz nicht mit, der Allylsenfölganteil nimmt im Gegenteil laufend ab.

Diese Tendenz beobachteten bereits PRITZKER und JUNGKUNZ (45). Die Autoren konnten im Extremfall in Speisesenfproben nach längerer Lagerzeit überhaupt kein Allylsenföl mehr nachweisen. Eigene Untersuchungen an älteren Speisesenfproben des Handels bestätigen diesen Befund. ANDRE und CARBOUERE (3) ermittelten in Braunsensamen einen "allylsenfölabbauenden Faktor", der im Gelbsenf nicht enthalten ist.

c. Untersuchung eines bitteren, industriell hergestellten Speisesenfs

Für die Zubereitung dieses Speisesenfs gelangte ein Senfmehl zur Anwendung, das durch Absichten aus dem Kern von Braunsaat gewonnen wurde. Die Schalen waren also weitgehend entfernt. Der Senf wies einen sehr scharfen, aber erheblich bitteren Geschmack auf und enthielt neben 0,15 % Allylsenföl noch 0,17 % Sinigrin. Der Senf verlor bei Zugabe von Myrosinase innerhalb kurzer Zeit seinen bitteren Geschmack. Auch ohne diese Maßnahme ging die Bitterkeit innerhalb einer Woche stark zurück. Der anfangs bittere Geschmack dieses Senfs muß auf die Anwesenheit eines beträchtlichen Restsinigrinanteils zurückgeführt werden, der sich nur langsam mit fortschreitender Spaltung des Glucosids verringert. Die tiefere Ursache der Bitterkeit liegt jedoch in einer gewissen "Enzymschwäche" begründet. Da die Myrosinase auch in den Schalen enthalten ist, wird durch die beschriebene Vorbehandlung der Samen ein Teil des Enzyms entfernt.

C. DISKUSSION DER UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

Die erarbeiteten papierchromatographischen, dünnschichtchromatographischen, spektralphotometrischen und enzymatisch-chemischen Methoden weisen - zum Teil in ihrer Kombination - der Analytik auf dem Gebiet der Senfölglycoside und des Allylsenföls neue Wege. Zugleich gestatten die Untersuchungsbefunde einen Einblick in das Problem der Ursache des Bitterseins von Speisesenf.

Die papierchromatographische Methode, basierend auf der Grundlage der Isolierung und nachfolgenden Erfassung der eluierten Glucoside mittels ihrer Absorption im UV-Bereich ermöglicht eine quantitative Bestimmung des Sinalbins sowie des Sinalbins und Sinigrins nebeneinander. Die Erfassung des Sinalbins verläuft mit einer Genauigkeit von 95 % nur befriedigend, wenn der Sinalbinanteil der Samen oder des Speisesenfs mindestens 0,1 % beträgt. Die wertbestimmenden Komponenten der Samen können somit in der ursprünglichen glucosidischen Form bestimmt werden. Die bisher bekannten Verfahren beruhen im Falle der Braunsaat auf der Ermittlung des bei der enzymatischen Spaltung entstehenden Allylsenföls. Die Bestimmung der Glucoside in Speisesenf konzentriert sich meist auf die Erfassung des Sinalbins, da der Sinigrinanteil infolge weitgehender Spaltung dieses Glucosids im allgemeinen so gering ist, daß es sich nur in schwach positiver Reaktion nachweisen läßt.

Die umfangreichen papierchromatographischen Untersuchungen dienen zunächst der Ermittlung optimaler Versuchsbedingungen, die eine quantitative Auswertung der Chromatogramme gestatten. Da sich mit einer großen Anzahl von Fließmittelsystemen aus den verschiedensten Verbindungen keine befriedigende Trennung der Glucoside Sinigrin und Sinalbin erreichen ließ, wurde eine Methode nach O. E. SCHULTZ und R. GMELIN (53) modifiziert. Die Verminderung des Wasseranteils im Fließmittelgemisch gegenüber SCHULTZ und GMELIN führt zu einer Erhöhung der R_f -Werte.

Die wesentlichste Änderung des Verfahrens von SCHULTZ und GMELIN, die aufsteigend mit begrenzter Laufstrecke der Fließmittelfront chromatographieren, liegt in dem Übergang zur absteigenden Chromatographie, die im Durchlaufverfahren größere Laufstrecken ermöglicht, wodurch sich Sinigrin und Sinalbin besser trennen. Damit kann man eine Abgrenzung in Sinigrin- und Sinalbinzonen vornehmen und die Glucoside anschließend eluieren. Da die Samen des gelben und braunen Senfs jeweils nur ein bestimmtes Senfölglicosid enthalten, kann man sich bei Gehaltsbestimmungen in den Samen auch mit geringeren Laufstrecken bzw. Laufzeiten der Chromatogramme begnügen. Eine geringe Beeinträchtigung der chromatographischen Trennung durch Begleitstoffe der Senfsamen, die jedoch beim Entfetten zum großen Teil entfernt werden, äußert sich in einem Zurückbleiben der Flecken um wenige Millimeter gegenüber den aufgetragenen Reinglucosiden. Die nur schwach ausgeprägte Störung fällt nicht ins Gewicht. Zudem kann bei Kenntnis der Reihenfolge, in der die beiden Glucoside erscheinen auf die Reinglucoside als Bezugssubstanzen verzichtet werden. Als Test zur Ermittlung der entsprechenden Glucosidzonen dient dann ein Randstreifen des Chromatogramms, an dessen Auftragungspunkt ebenfalls der glucosidhaltige Senfauszug berücksichtigt ist. Bei den Samen ist das Entfernen des hohen Fettanteils von etwa 30 % zwecks einwandfreier chromatographischer Isolierung des jeweiligen Senfölglicosids unbedingt erforderlich. Die Maßnahme ist bei der Untersuchung von Speisesenf nicht immer notwendig, da zu dessen Herstellung häufig schon teilweise entfettete Senfmehle herangezogen werden.

Eine wichtige Rolle kommt der Auswahl des Chromatographiepapiers zu. Die Verwendung säuregewaschenen Papiers ist die Voraussetzung für ein quantitativ auswertbares Chromatogramm, da nicht gereinigte Sorten im Meßbereich der Glucoside eine zu hohe, unspezifische und unkontrollierbare Absorption aufweisen. Auch bei Einhaltung dieser Bedingungen genügt es nicht, nur im Absorptionsmaximum der Glucoside abzulesen, vielmehr muß das gesamte Absorptionsspektrum zwischen 260 und 220 nm dem einer

reinen Glucosidlösung entsprechen. Bei Verwendung von Geräten ohne Schreiber kann man sich hiervon durch die zusätzliche Messung weniger sinnvoll über den kritischen Bereich verteilter Extinktionswerte überzeugen. Auf diese Weise soll sichergestellt werden, daß der störende Einfluß des Papiers durch die Vergleichsprobe vollständig kompensiert wird, und die gemessene Extinktion im Absorptionsmaximum tatsächlich dem Glucosidanteil zukommt. Auch bei einer maßvollen Abweichung des ermittelten Kurvenverlaufs gegenüber den Spektren der Reinglucoside kann man die Meßergebnisse auswerten und den in diesen Fällen durch das Ablesen der Extinktion im Absorptionsmaximum der Glucoside entstehenden Fehler mittels Extrapolieren ausgleichen.

Die dünnschichtchromatographischen Versuchsergebnisse sind als eine Ergänzung und Bestätigung der papierchromatographischen Untersuchungsbefunde anzusehen. Die quantitative Auswertung der Dünnschichtchromatogramme durch Elution der Glucoside und Messung ihrer UV-Absorption scheitert daran, daß sich im Vergleich zu den Papierchromatogrammen nur geringe Glucosidkonzentrationen auftragen lassen. Entsprechende Glucosidmengen führen zu einem Ineinanderfließen der Sinigrin- und Sinalbinflecken. Außerdem werden ähnlich wie aus dem Papier auch aus dem Kieselgel Stoffe eluiert, die im kurzwelligen UV-Bereich eine stärkere, unspezifische Störabsorption verursachen. Im geeigneten Konzentrationsbereich käme möglicherweise eine quantitative Auswertung auf Grund der Größe und Intensität der Flecken in Betracht. Das Auftreten des Cholins bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung von Speisesenf und älteren Samenauszügen läßt sich mit der Spaltung des Sinapinsäurecholinesters (Sinapin) begründen. Das Sinapin tritt nicht nur im Gelbsenf als Bestandteil des Sinalbins auf, auch Braunsenf enthält diese Verbindung in Form des Bisulfats.

Die Verfahren zur Gehaltsbestimmung des Allylsenföls in Senfsamen gliedern sich in zwei Reaktionsstufen, die enzymatische Spaltung des Sinigrins und die nachfolgende Erfassung des Senföls mit chemischen oder physikalisch-chemischen Methoden.

Die Untersuchungsergebnisse lehren, daß dem Ablauf der enzymatischen Reaktion eine wesentlich größere Beachtung zukommt, als sie ihm bisher im allgemeinen beigemessen wurde. Die Verschiedenartigkeit der zur Erfassung des enzymatisch gebildeten Senföls angewandten Methoden tritt demgegenüber in den Ergebnissen weniger in Erscheinung. Die bisher bekannten Methoden zur Bestimmung des Allylsenföls in Senfsamen gehen von einer zweistündigen Inkubation bei Zimmertemperatur aus und erfassen häufig nicht das gesamte Allylsenföl bzw. Sinigrin. Die Verfahren des DAB VI, der PHARMACOPOEA HELVETICA V und H. WOJAHNs sind daher als Konventionsmethoden zu betrachten. Hierbei kann es vorkommen, daß Senfsamen mit geringer Myrosinaseaktivität als minderwertig eingestuft werden, obwohl sie einen beachtlichen Sinigringehalt aufweisen. Ein derartiges Saatgut kann beim Vermischen mit enzymreicheren Samen, z.B. auch Gelbsaat, durchaus zur Herstellung eines Speisesenfs verwendet werden. Nach BARTLETT und GRÉENISH (19) enthalten die Samen zwar für gewöhnlich etwa die dreifache Menge der zur Spaltung des Sinigrins notwendigen Myrosinase, bei unbekannter Provenienz des Saatguts müssen jedoch im Einzelfall Enzymschädigungen in Betracht gezogen werden. Bei Gehaltsbestimmungen in "enzym schwachen" Saaten gelang es, unter Berücksichtigung der Kriterien der optimalen Senfölbildung - Inkubation bei 60° C in schwachsaurem Milie (Citratpufferlösung) bei Hinzufügen eines selbst hergestellten Myrosinasepräparates - das Allylsenföl vollständig in Freiheit zu setzen. Die Bedingungen einer optimalen Sinigrinspaltung ließen sich bei Verwendung des Reinglycosids besonders deutlich studieren. Die bereits mitgeteilten Ergebnisse bestätigen gleichzeitig die große Genauigkeit der Hypojodit-Methode zur Erfassung des Allylsenföls.

In der Literatur wird teilweise die Ansicht vertreten, daß eine quantitativ verlaufende enzymatische Spaltung des Sinigrins in Allylsenföl, Kaliumbисульфат und Glucose nicht möglich ist. Die unterschiedlichen Befunde gaben zu voneinander abweichenden Deutungen des Reaktionsverlaufs Anlaß. VON EULER und ERIKSON (15) sowie NEUBERG und SCHOENEBECK (40) erkannten, daß sich die Myrosinase als Enzymkomplex aus zwei Teilfermenten aufbaut, der Myrosulfatase, welche die Ätherschwefelsäurebindung,

und der β -Thioglucosidase, welche die Thioglucosidbindung spaltet. Zunächst soll die Sulfatase angreifen und neben Kaliumbisulfat ein als Merosinigrin bezeichneter Glucose-Senföl-Komplex entstehen, den bereits SCHNEIDER und WREDE (51) auf chemischen Wege erhielten. Diese Reaktion verläuft quantitativ. Die β -Thioglucosidase spaltet unter Wasseraufnahme das Merosinigrin in Glucose und Allylsenföl. Dieser Teil der Umsetzung soll nicht quantitativ vor sich gehen und nach TERRY (60) als Gleichgewichtsreaktion aufzufassen sein, die durch Kaliumbisulfat beeinflusst wird und zusammen mit der Einwirkung des Wassers zu Nebenprodukten führt (Nitrile, S, CS₂, H₂S, SO₂ und Hydroxylamin). Die Spaltung der Thioglucosidbindung soll nur zu 66 % verlaufen. NEUBERG (40) findet in Sinigrinansätzen nach Inkubation bei 37° C eine maximale Thioglucosidasespaltung von 72 %. GADAMER (16) berichtet über eine Ausbeute von 84 % Senföl, die über das von TERRY (60, 20) formulierte Gleichgewicht wesentlich hinausreicht. Neuere Untersuchungen von GAINES und GOEHRING (18) sowie VIRTANEN und GMELIN (62) ergaben jedoch eine quantitative Senfölbildung, die sie durch die Erfassung sowohl des Senföls als auch der beiden anderen Spaltprodukte nachweisen konnten. - Inzwischen hatten ETTLINGER und LUNDEEN (14) die lange Zeit gültige Strukturformel GADAMERS (16) korrigiert. Während GADAMER (16) die Struktur der Senfölglycoside von der N-Alkyl- oder N-Aryl-Iminothiolkohlen-säure ableitet, die in Form der mit Schwefelsäure gepaarten S-Glycoside vorliegt, sind sie nach ETTLINGER und LUNDEEN (13, 14) als am Sauerstoff mit Schwefelsäure acylierte und am Schwefel glucosidierte Thiolhydroximsäuren aufzufassen, wobei eine durchgehende C-Kette resultiert und einige Reaktionen, die mit der Formel GADAMERS nicht in Einklang zu bringen sind, gedeutet werden können. Nach diesem durch die Synthese eines Senfölglycosids (Glucotropaeolin = Benzylsenfölglycosid) erhärteten Strukturbeweis stellt sich von neuem die Frage nach dem Mechanismus der enzymatischen Spaltung, da nicht mehr wie nach der Formel GADAMERS durch die Abspaltung des Sulfats und der Glucose bereits das Senföl resultiert, sondern noch eine Umlagerung des verbleibenden Restmoleküls stattfinden muß. ETTLINGER und LUNDEEN (14) sowie CLAPP, REESE und MANDELS ziehen die Notwendigkeit von zwei Enzymsystemen zur Spaltung der Senfölglycoside in Zweifel und vermuten, daß die Thioglucosidase allein für die Senfölbildung ausreicht, die im Sinne einer enzymatisch aktivierten Lossen-Umlagerung verlaufen soll. Vor wenigen Jahren gelang GAINES und GOEHRING (18) die elektrophoretische Isolierung der beiden Teilenzyme, die jeweils nur Glucose oder Sulfat abspalten, jedoch für sich allein keine Senfölbildung veranlassen können. Nach Vereinigung der beiden Teilfraktionen beobachteten sie einen quantitativen Verlauf der Sinigrinspaltung. Die Autoren vermuten die Beteiligung eines "dritten Faktors" des Myrosinase-Komplexes bei der Umlagerung des nach Abspaltung der Glucose und des Sulfats verbleibenden Restmoleküls.

Nach den bisherigen Erkenntnissen ist eine experimentell gesicherte Aussage, ob die beiden Teilenzyme gleichzeitig oder nacheinander und in welcher Reihenfolge angreifen, nicht möglich. Auf welche Weise sich das verbleibende Restmolekül umlagert, ob rein chemisch oder unter Beteiligung eines dritten noch unbekannten Faktors enzymatischer Natur, kann nicht entschieden werden.

Das Ausmaß der enzymatischen Spaltung des Sinigrins hängt, neben der Aktivität der Enzymlösung und der Inkubationstemperatur, weitgehend von der Zusammensetzung der angewandten Pufferlösung ab. Der Einsatz eines Puffers ist notwendig, da mit fortschreitender Reaktion Bisulfat entsteht, das infolge Bildung eines sauren Milieus die Myrosinase hemmen würde. Die Verwendung einer Citratpufferlösung vermag bei einem pH-Wert von 6,8 die Aktivität der Myrosinase nicht zu beeinträchtigen und führt zu einer quantitativen Spaltung des Sinigrins. GAINES und GOERING (18) erzielten auch bei pH 6,2 (ebenfalls Citratpuffer) eine vollständige Umsetzung. Die Myrosinase scheint also kein ausgeprägtes pH-Optimum aufzuweisen, entsprechend den Angaben von SANDBERG und HOLLY (49), die einen ausgedehnten Bereich hoher Aktivität von pH 5,4 - 7,4 ohne klar definiertes pH-Optimum annehmen. Das Verhalten der Myrosinase wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß sich die Wirksamkeit des Gesamtzyms aus den Aktivitäten der beiden Teilenzyme zusammensetzt. Hierbei resultiert ein breiter pH-Bereich mit hoher Aktivität.

WEIS-FOGH (65) gibt ein pH-Optimum von 6,5 bis 7,5 an, während nach NEUBERG und SCHÖNEBECK (40) die "optimalen Verhältnisse" der enzymatischen Sinigrinspaltung bei pH 7 liegen. Letztere fanden unterhalb von pH 3 eine vollständige Schädigung der Thioglucosidase, während GAINES und GOEHRING (18) den völligen Aktivitätsverlust der Sulfatase feststellen. Das andere Teilenzym zeigte jeweils noch eine begrenzte Wirksamkeit.

Die widersprüchlichen Befunde bei der Spaltung des Sinigrins müssen auf die Verwendung unterschiedlicher Pufferlösungen zurückgeführt werden. In früheren Arbeiten dienten vielfach Phosphatlösungen als Puffer.

MOMBELET und DASTUGUE (37) bezeichnen die Gegenwart von Phosphat für die enzymatische Sinigrinspaltung als besonders vorteilhaft. Vor wenigen Jahren konnten jedoch GAINES und GOEHRING (18) den hemmenden Einfluß des Phosphats auf die Thioglucosidase nachweisen und damit die Erscheinung erklären, daß in früheren Arbeiten die Freisetzung der Glucose nicht das theoretisch zu erwartende Maß erreichte. Die Wirksamkeit der Sulfatase wird durch Phosphat nicht beeinträchtigt. Mit den von NEUBERG und Mitarbeitern (40-42) verwendeten Bariumsalzen vollzieht sich zwar eine vollständige Sulfatasespaltung, jedoch keine quantitative Senfölbildung. Wahrscheinlich ist auch hier eine Hemmung der Thioglucosidase durch die Bariumverbindungen anzunehmen.

Im Speisesenf wirkt neben den Samen selbst der beigegefügte Essig in Verbindung mit Salzen als Puffer und verhindert damit eine Inaktivierung der Myrosinase infolge zu starken pH-Abfalls. Andererseits verursacht der Essig eine Verzögerung der enzymatischen Spaltung, die zwischen pH 3 - 4 nicht in ihrem optimalen pH-Bereich ablaufen kann. Das Allylsenföl wird erst nach und nach frei; es vollzieht sich eine durchaus erwünschte, langsame Reifung des Speisesenfs.

Das Temperaturoptimum der enzymatischen Sinigrinspaltung läßt sich nach den Untersuchungen mit Montana-Braunsenf bei 55 - 60° C festlegen. Dieser Befund wird auch durch die Ergebnisse der enzymatischen Spaltung des Sinalbins unter Rhodanidbildung bestätigt. Eine mit steigender Inkubationstemperatur erhöhte Senfölausbeute läßt sich nur in Saatgut mit relativ niedriger Myrosinasewirkung deutlich beobachten. In Samen mit hoher Enzymaktivität wird häufig bereits bei Zimmertemperatur das Allylsenföl nahezu vollständig in Freiheit gesetzt. Allerdings ist in diesen Fällen eine längere Reaktionszeit erforderlich.

Während im Kommentar zur PHARMA COPOEA HELVETICA V (44a) lediglich bei einer Erwärmung des Versuchsansatzes auf eine verstärkte Senfölbildung hingewiesen wird, gibt WEIS-FOGH (65) das Temperaturoptimum zwischen 30 und 40° C an. GAINES und GOEHRING (18) erzielen bei 37° C eine quantitative Umsetzung. NEUBERG und SCHOENEBECK (40) nehmen eine optimale Enzymwirkung ebenfalls bei 37° C an. Sie können selbst bei 65° C noch eine Enzymaktivität nachweisen. Nach 15 Minuten bei 65° C läßt sich noch eine 20 %ige Thioglucosidase- und eine 92 %ige Sulfatasewirkung beobachten. Nach drei Stunden ist die Sulfataseaktivität erloschen, aber immer noch eine 20 %ige Thioglucosidasewirkung festzustellen.

Das Auftreten von Nebenprodukten bei der enzymatischen Spaltung des Sinigrins wie Cyanallyl, H_2S , SO_2 , S, CS_2 , NH_3 und Hydroxylamin hält sich mengenmäßig in engen Grenzen und beeinträchtigt die Genauigkeit der jodometrischen Verfahren nur geringfügig. Da außerdem alle flüchtigen, reduzierend wirkenden Stoffe miterfaßt werden, sind die Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen in den Samen und in Speisesenf als etwas zu hoch anzusehen. Beim Speisesenf bedingen in geringem Maße die ätherischen Öle der beigegeführten Gewürze einen zusätzlichen, unkontrollierbaren Fehler. Der Anteil der Gewürze kann bis zu 0,5 % betragen. Da bei der Herstellung von Speisesenf je nach Geschmacksrichtung wechselnde Mengen Gelb- und Braunsaat Verwendung finden, kommt dem Einfluß der Gelbsenfsamen auf die Bestimmungsmethoden des Allylsenföls besondere Bedeutung zu. Sie verursachen im allgemeinen nur einen verhältnismäßig geringen Fehler, der allerdings bei der Bestimmung kleiner Mengen an Allylsenföl in Speisesenf stärker ins Gewicht fällt. Es handelt sich in solchen Fällen jedoch größtenteils um ältere Senfzubereitungen, deren Destillate unter Umständen überhaupt keinen Jod- bzw. Silbernitratverbrauch hervorrufen.

Bereits PRITZKER und JUNGKUNZ (45) konnten in einigen Speisesenfproben kein Allylsenföl nachweisen, obwohl sie noch befriedigende organoleptische Eigenschaften zeigten.

In solchen Senfproben muß der etwas mildere Geschmack dem aus dem Gelbsenfanteil stammenden p-Hydroxybenzylsenföl zugeschrieben werden. Die Ursache des von den Gelbsenfestillaten beobachteten Jodverbrauches ist in geringen Mengen reduzierender Substanzen zu sehen, die beim Erhitzen des Ansatzes übergehen. In erster Linie dürften es Zersetzungsprodukte des Sinalbins und des p-Hydroxybenzylsenföls sein. Allerdings konnten auch Spuren anderer Senföle in Frage. KJAER und CONTI (23) wiesen z.B. in 100 g weißen Senfsamen 3 mg Isopropylsenföl nach. In Braunsaat konnte bisher außer Sinigrin kein weiteres Senfölglicosid gefunden werden.

Nach Untersuchungen von SCHULTZ und GMELIN (54) enthalten viele Pflanzen mehrere Senfölglicoside. Im Höchstfall, wie z. B. in den Samen von *Brassica napus* treten vier verschiedene Senfölglicoside nebeneinander auf.

Das spektralphotometrische Verfahren zur Bestimmung des Allylsenföls geht in seinen Grundzügen, der Erfassung des mit Ammoniak gebildeten Allylthioharnstoffs durch Messung der UV-Absorption, auf die Untersuchungen von KJAER, CONTI und LARSEN (32) zurück. In der hier modifizierten und auf die Verhältnisse einer Gehaltsbestimmung in Braunsaat und Speisesenf abgestimmten Form stellt es eine interessante Bereicherung der Analytik auf diesem Gebiet dar. Die genannten Autoren geben das Absorptionsmaximum der Verbindung in wasserfreiem Methanol bei 242 nm an. Nach eigenen Beobachtungen, die auf einer wiederholten Aufzeichnung des Spektrums wässriger Lösungen unter Ausweitung des kritischen Meßbereichs beruhen, muß das Maximum jedoch bei 237 nm festgelegt werden. Die Messung der UV-Absorption des Allylthioharnstoffs in wässriger Lösung erweist sich als zweckmäßig, da im Zuge der Gehaltsbestimmung nach der modifizierten Methode die Verbindungen in diesem Medium gelöst vorliegt.

KJAER, CONTI und LARSEN (23, 32) weisen eine Vielzahl flüchtiger Senföle in den Samen verschiedener Pflanzen nach. Die Thioharnstoff-Derivate werden zunächst papierchromatographisch getrennt und nach Elution mit wasserfreiem Methanol durch Messung der UV-Absorption bestimmt. Die Absorptionsspektren der "natürlichen" Thioharnstoffe sind von einer unspezifischen Absorption überlagert, die im Bereich von 260 - 220 nm stark ansteigt und unbekannten, löslichen Beimengungen aus der Pflanze zugeordnet wird. Die Autoren umgehen die Störung durch die Einführung von Korrekturfaktoren. Die Ermittlung eines Anteils von 3 mg% Isopropylsenföl in *Sinapis alba* stellt für die Analytik der Senföle in Speisesenf ein bemerkenswertes Ergebnis dar.

Die von KJAER, CONTI und LARSEN (32) beschriebene Störung deckt sich weitgehend mit unseren Beobachtungen bei der Auswertung der UV-Spektren des Sinigrins und Sinalbins nach papierchromatographischer Trennung und Elution mit Wasser oder Methanol. Die Störabsorption bei den Spektren der Thioharnstoff-Derivate könnte auch hier zum Teil auf Verunreini-

gungen aus dem Chromatographiepapier zurückgeführt werden, die bei der Elution mit Methanol in die Meßlösung gelangen. KJAER und Mitarbeiter ermittelten Senfölgehalte in der Größenordnung von 10 mg% in verschiedenen Pflanzen. Nach eigenen Untersuchungsbefunden überwiegt bei Allylsenfölbestimmungen in Braunsenf das Senföl mit etwa 1 % derart, daß eine Störung durch Begleitstoffe aus den Samen, die zudem flüchtig sein müßten, um in die Meßlösung zu gelangen, entfällt. Der größte Teil dieser Substanzen dürfte sich außerdem beim Vertreiben des Alkohols nach der Allylthioharnstoffbildung verflüchtigen. Das Spektrum des aus Braunsenf erhaltenen Allylthioharnstoffs ist mit dem der reinen Verbindung identisch, durch keinerlei Störabsorption gekennzeichnet und eine chromatographische Isolierung daher nicht notwendig. Da sich in entsprechend gewonnenen Gelbsenfdestillaten nur eine geringe, unspezifische Absorption beobachten läßt, muß lediglich bei der Untersuchung von Speisesenf, der einen geringen Allylsenfölanteil enthält, mit einer Störung gerechnet werden. Die Erscheinung liegt in diesen Fällen darin begründet, daß sich die Notwendigkeit einer größeren Senfeinwaage ergibt, wodurch sich auch der störende Einfluß der Begleitstoffe wesentlich erhöht. Der Verlauf des UV-Spektrums im kritischen Absorptionsbereich läßt auch hier erkennen, ob die gemessene Extinktion dem Thioharnstoff allein zuzuordnen ist. In den meisten Fällen kann man durch Extrapolieren einen größeren Fehler vermeiden.

Die Ergebnisse der Gehaltsbestimmungen in Braunsensfsamen liegen um etwa 3 % niedriger als die der auch andere flüchtige und reduzierende Stoffe erfassenden jodometrischen Verfahren und dürften eine größere Genauigkeit als jene aufweisen. Insgesamt bewegt sich der in verschiedenen Braunsanen ermittelte Allylsenfölgehalt innerhalb einer erklärlichen, biologischen Schwankungsbreite.

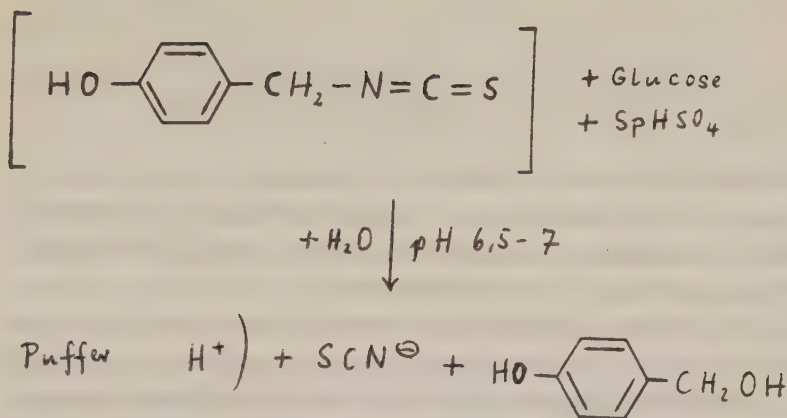
Aus der Literatur sind noch eine Anzahl weiterer Verfahren zur Bestimmung des Allylsenföls bekannt, welche die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse noch nicht oder nur zum Teil berücksichtigen. Nach DIRCKS (12) bzw. der Modifikation von SCHLICHT (50) wird

das Senföl mit KMnO_4 oxydiert und das entstehende Sulfat mit Bariumchlorid gravimetrisch erfaßt. HASELHOFF (21) verwendet Brom als Oxydationsmittel. GRÜTZNER (64) erhält bei der Oxydation des Allylthioharnstoffs mit Natriumperoxid ebenfalls Sulfat. Außerdem werden noch einige Verfahren beschrieben, die auf einer Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL beruhen. WEHRMANN (64) führt die Bestimmung direkt im Senföl durch, während PASSON (43) das Senföl in Eisessig destilliert und aus diesem die Stickstoffbestimmung vornimmt. WEHRMANN, WEGENER, BRAUNWARTH und MEYER (64) vergleichen die damals bekannten Verfahren, die zum Teil oben skizziert sind und empfehlen die argentometrische Methode als die beste und zuverlässigste, auch für Senfsamen. In neuerer Zeit wurde von BOEHME (8) ein alkalimetrisches Verfahren entwickelt. BERKA und ZYKA (7) geben eine maßanalytische Methode an, die auf der potentiometrischen Titration des Allylthioharnstoffs mit KJO_3 - oder KJO_4 -Lösung basiert.

Das zur Gehaltsbestimmung des Sinalbins entwickelte und als Rhodanid-Methode bezeichnete Verfahren erlaubt eine genaue Erfassung des bisher nur unzureichend analysierbaren Senföglucosids des gelben Senfs. Es besteht hiermit die Möglichkeit einer Wertbestimmung der Samen und der Gelbsaat enthaltenden Zubereitungen.

Der Reaktionsverlauf der Rhodanidbildung aus Sinalbin läßt sich wie folgt deuten:

Unter Einwirkung der Myrosinase entsteht zunächst p-Hydroxybenzylsenföl, das bei neutralem pH-Wert unbeständig ist und sofort in anorganisches Rhodanid und p-Hydroxybenzylalkohol zerfällt:



In einer weiteren Reaktion dürfte das entstehende anorganische Rhodanid zum Teil mit dem Sinapin ein schwer lösliches Salz bilden. Dadurch besteht die Gefahr, daß Rhodanid bei der anschließenden Bestimmung mit dem Brom-Benzidin-Pyridin-Reagenz nicht erfaßt wird. Die Behandlung des Ansatzes mit NaOH verfolgt den Zweck, das Sinapin zu spalten und das verbleibende SCN^- der quantitativen Bestimmung mit dem Reagenz zugänglich zu machen. Die Reaktion läßt sich als die alkalische Verseifung eines Esters, des Sinapinsäurecholinesters auffassen.

Die Bildung von Rhodanid aus einem Senfölglicosid stellt zwar eine Ausnahme, aber keinen Einzelfall dar. VIRTANEN (62) beschreibt eine analoge Reaktion beim Abbau des Glucobrassicins, einem Indolylmethyl-Senfölglicosid, das im Kohl vorkommt und sieht die Ursache der Rhodanidbildung im spontanen Zerfall des intermediär entstehenden Senföls.

Die Funktion des Essigs im Speisesenf besteht also nicht nur darin, die organoleptischen Eigenschaften des Senfs zu verbessern, es kommt ihm außerdem die Aufgabe zu, den Zerfall des enzymatisch gebildeten p-Hydroxy-

benzylsenföls zu verhindern oder zumindest zu verzögern. Während die Spaltung des Sinalbins im sauren pH-Bereich nicht quantitativ verläuft, kann sich im neutralen durch den Abbau des entstehenden Senföls das vermutlich existierende Gleichgewicht immer neu einstellen, bis schließlich das gesamte Glucosid unter Rhodanidbildung gespalten ist.

Die Methode ist als sehr empfindlich zu bezeichnen, da bereits Sinalbinmengen in der Größenordnung von 1 mg% erfaßt werden. Bei der Beurteilung der Genauigkeit ist zu beachten, daß auf Grund des hohen Molekulargewichts des Sinalbins 1 Teil Rhodanid etwa 13 Teilen des Glucosids entspricht. Die Rhodanid-Methode weist etwa die gleiche Genauigkeit wie die papierchromatographisch-spektralphotometrische auf, beansprucht jedoch einen wesentlich geringeren Zeitaufwand und ist daher diesem Verfahren vorzuziehen. Außerdem ist die Rhodanid-Methode weniger abhängig von äußeren, unkontrollierbaren Einflüssen, wie z. B. der Beschaffenheit des Chromatographiepapiers. Begleitsubstanzen des Senfs vermögen die Rhodanidbestimmung auch im Extremfall nicht entscheidend zu stören. Die Reaktion des Rhodanids mit dem Brom-Benzidin-Pyridin-Reagenz beruht auf der Bildung eines porphyrinartigen Farbstoffs, dessen Konstitution noch ungeklärt ist.

Die Bestimmung des Restsinalbins in Speisesenf wird durch die Anwesenheit des p-Hydroxybenzylsenföls erschwert. Auf Grund seiner chemischen Eigenschaften - unbeständig, Neigung zu Polymerisation, undefinierbare, harzige Konsistenz - dürfte es im Speisesenf nicht mehr in der ursprünglichen Form vorliegen, wie es bei der Spaltung des Sinalbins zunächst entsteht. Daraus wird verständlich, warum sich nicht auch das p-Hydroxybenzylsenföl des Speisesenfs quantitativ in Rhodanid überführen und auf diese Weise bestimmen läßt. Die unterschiedlichen Rhodanidwerte von und nach der Neutralisation eines Speisesenfansatzes, wobei die Myrosinase jeweils inaktiviert wird, lassen jedoch zumindest auf eine teilweise Umlagerung des Senföls unter Rhodanidbildung schließen. Dieser Vorgang läßt sich nicht genau standardisieren und führt daher zu Schwankungen des

dem Zerfall des bereits vorhandenen p-Hydroxybenzylsenföls zugeordneten Rhodanidwerts, die sich in abgeschwächter Form auch auf die Ergebnisse der Sinalbinbestimmungen übertragen. Der Sinalbingehalt des Speisesenfs ergibt sich aus der Differenz des Gesamtrhodanids und eines Vergleichserts, der den bereits im Senf enthaltenen und den durch teilweise Umlagerung des p-Hydroxybenzylsenföls entstehenden Rhodanidanteil erfaßt. Der durch den Einfluß des bereits im Senf vorhandenen p-Hydroxybenzylsenföls entstehenden Fehler dürfte insgesamt etwa 10 % betragen und damit in der gleichen Größenordnung liegen wie bei den Gehaltsbestimmungen nach papierchromatographischer Isolierung. Die Bestimmung des Sinalbins in den Samen wird von den geschilderten Vorgängen nicht berührt. Nach den Untersuchungen unter Verwendung von Reinglucosid läßt sich die Genauigkeit der Methode auf etwa 95 % abschätzen. Der wechselnde Sinalbingehalt der Samen unterschiedlicher Herkunft (2, 3 - 4, 5 %) liegt innerhalb der zu berücksichtigenden biologischen Schwankungsbreite.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Gehaltsangaben, deren Ursache auf das Fehlen einer exakten Bestimmungsmethode zurückzuführen ist. TERRY und CORRAN (60) sowie BAUER und HOLLE (5), deren Ergebnisse auf Sulfatbestimmungen nach der enzymatischen Spaltung des Glucosids beruhen, geben etwa 10 % bzw. bis zu 15 % Sinalbin an. Diese Befunde werden häufig angezweifelt und sind als zu hoch anzusehen. VIEHOEVER und NELSON (61) schlagen ein Verfahren vor, das von der erschöpfenden Extraktion der entfetteten Samen ausgeht. Die Ergebnisse von etwa 2,5 % Sinalbin stimmen mit der Ausbeute überein, die GADAMER (16) und ROJAHN (47) auf ähnlichem Wege bei der Darstellung des Glucosids aus Senfsamen erhielten. SZAHLANDER (59) ermittelt nach enzymatischer Spaltung des Sinalbins der entfetteten Samen das entstehende p-Hydroxybenzylsenföl gewichtsanalytisch durch Extraktion mit Äther und gibt einen Gehalt von etwa 2 % Senföl an. Dagegen erhält HALBACH (20), der ähnliche Untersuchungen unter Verwendung von Reinglucosid vornimmt, lediglich ein undefinierbares, harzartiges Produkt in unbefriedigender Ausbeute.

Die unterschiedliche Reaktion wässriger Auszüge von Gelb- und Braunsenfansätzen mit Eisen-(III)-chlorid ermöglicht in einfacher und schnell durchzuführender Weise eine Differenzierung der beiden Senfarten. In Gemischen läßt sich der Gelbsenfanteil gut erkennen. Ob die Reaktion hauptsächlich auf die Anwesenheit von p-Hydroxybenzylsenfölen oder des Rhodanids zurückgeht, ist in diesem Zusammenhang von sekundärer Bedeutung. Wahrscheinlich sind beide Verbindungen daran beteiligt. Die spezifisch auf Rhodanid ansprechende Reaktion mit dem Brom-Benzidin-Pyridin-Reagenz verläuft positiv, wenn auch nicht so eindeutig wie bei der quantitativen Bestimmung des Sinalbins.

Für das Auftreten eines bitteren Geschmacks in Speisesenf sind in erster Linie die Senfölglycoside, besonders das Sinigrin verantwortlich. Bedeutsam scheint die Beobachtung, daß mit dem Fortschreiten der enzymatischen Spaltung auch der bittere Geschmack abnimmt und schließlich ganz verschwindet. Die Erscheinung wird durch eine verminderte Myrosinaseaktivität des Senfs verursacht, die zur Folge hat, daß nur eine zögernde Sinigrinspaltung eintritt, die im Extremfall auch über einen längeren Zeitraum nicht vollständig verläuft und dann in Abhängigkeit von der Glycosidkonzentration einen mehr oder weniger deutlich erkennbaren bitteren Geschmack hinterläßt. Infolge seiner vorwiegend adstringierenden Wirkung ist das Sinalbin nur bedingt in der Lage im Speisesenf einen bitteren Geschmack hervorzurufen. In geringem Umfang vermögen auch die Sinapinverbindungen, besonders das Rhodanid zu dem bitteren Geschmacksempfinden eines Senfs beizutragen, obwohl auch hier die adstringierende Komponente vorherrscht. Nach den Untersuchungsergebnissen läßt sich einerseits nicht ausschließen, ob noch andere Verbindungen bei der Ausbildung des bitteren Geschmacks im Speisesenf beteiligt sind, andererseits ergeben sich keinerlei Anhaltspunkte für bisher unentdeckte Komponenten mit bitteren Eigenschaften.

Das bittere Geschmacksempfinden ist in hohem Maße von subjektiven Einflüssen abhängig. Besonders bei geringer Bitterkeit erkennen Unbe-

fangene keinen bitteren Geschmack, während eingeweihte Beobachter in gewissem Sinne "sensibilisiert" sind. Eine deutlich bittere Probe wird im Extremfall von manchem Prüfer überhaupt nicht als bitter empfunden. Beim Testen von Speisesenf kommt erschwerend hinzu, daß der bittere Geschmack immer von der scharfen Komponente der Senföle überdeckt wird, und die Sinnesorgane bei aufeinanderfolgenden Versuchen rasch abstumpfen. Die Bitterkeit äußert sich erst nach einigen Sekunden im Nachgeschmack. Hierbei ist es unerläßlich, die Kostprobe hauptsächlich im hinteren Teil des Mundraumes zwischen Zunge und Gaumen zu verteilen, da sich an der Zungenspitze ein bitterer Geschmack der Senfproben nicht wahrnehmen läßt.

D. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Herstellung und Reinigung eines Myrosinase-Präparats

Um eine rhodanidfreie Enzymlösung zu erhalten, wurde das Verfahren nach NEUBERG und WAGNER (41) folgendermaßen modifiziert:

Etwa 100 g zermahlener Gelbsenfsamen werden 20 Minuten mit einem elektrischen Rührer behandelt. Nach dem Zentrifugieren fällt man die noch nicht ganz klare Lösung mit dem gleichen Volumen 90 %igen Alkohols. Es folgen Abzentrifugieren der ausgeschiedenen Masse, Anschütteln mit 70 %igem Alkohol und erneutes Zentrifugieren. Der auf diese Weise gereinigte Niederschlag wird in 100 ml Wasser suspendiert und nach zwölfstündigem Stehen bei Zimmertemperatur filtriert. Die so erhaltene Myrosinaselösung weist eine hohe Aktivität auf, enthält jedoch noch Sinapin-rhodanid. Die Reinigung der Enzymlösung von Rhodanid gelingt durch wiederholtes Füllen mit 70 %igem Alkohol und Auflösen der Fällung in destilliertem Wasser. Hierbei ist darauf zu achten, daß das Enzym nur möglichst kurze Zeit mit dem Alkohol in Berührung kommt. - Die Reinigung des Enzyms mittels Ionenaustauscher bewährt sich insofern nicht, als man hierbei zu verdünnte Lösungen erhält. - Die Myrosinaselösung weist eine leichte Trübung auf und ist bei Aufbewahrung im Eisschrank längere Zeit haltbar.

II. Gewinnung der Glucoside Sinigrin und Sinalbin

Es gelangte in den Grundzügen das Verfahren nach GADAMER (16) jedoch mit einigen Änderungen zur Anwendung:

Etwa 200 g zermahlene Samen werden in einer Soxhlet-Apparatur mit Petroläther 6 - 8 Stunden entfettet. Anschließend extrahiert man das trockene Pulver im gleichen Gerät 4 - 5 Stunden mit Alkohol, kocht es mit der doppelten Menge Alkohols aus und preßt scharf ab. Die auf diese Weise erhaltenen

alkoholischen Extrakte werden vereinigt, auf die Hälfte ihres Volumens eingedampft und mit Hilfe eines Heißwassertrichters warm durch ein Faltenfilter filtriert. Beim Abkühlen in Eis fallen Kristalle in Form von feinen gelblichen Flocken oder Nadeln aus. Nach dem Umkristallisieren in Alkohol wird das Glucosid in der gerade erforderlichen Menge heißen Wassers gelöst, mit Tierkohle entfärbt und in 200 ml heißen Alkohol hineinfiltriert. Beim Abkühlen in Eis scheidet sich ein nunmehr gereinigtes Glucosid aus. Die Ausbeute beträgt etwa 0,5 - 1 %, ist aber häufig unbefriedigend, auch nach den Beobachtungen von MORELL und LINK (38), die aus diesem Grunde die wesentlich aufwendigere Methode von HERISSEY und BOIVIN (22) empfehlen. Die von uns erhaltenen geringen Glucosidmengen waren für den beabsichtigten Verwendungszweck als Bezugssubstanzen für die papier- und dünnschichtchromatographischen Untersuchungen auch in Bezug auf ihren Reinheitsgrad völlig ausreichend. Für die späteren Untersuchungen wurden Reinglucoside der Firma MAY-BACH herangezogen, deren Überprüfung mittels Elementaranalyse einen 100 %igen Reinheitsgrad ergab.

III. Darstellung von Sinapinrhodanid aus Braunsenfarnen

Die Vorschrift ist KLEINs Handbuch der Pflanzenanalyse (36) entnommen: Der alkoholische Extrakt (Soxhlet) aus 100 g Braunsaat wird zum Sirup eingedampft und durch Ausschüttlung mit Benzin vom Fett befreit. Unter Zusatz von Wasser scheiden sich harzige Substanzen ab. Nach dem Filtrieren dampft man erneut zum dünnen Sirup ein, setzt Kaliumrhodanid im Überschuß zu und überläßt die Flüssigkeit 3 - 4 Wochen sich selbst. Es scheidet sich ein rohes Sinapinrhodanid aus, das nach dem Absaugen durch mehrmaliges Umkristallisieren - abwechselnd mit kochendem Wasser und Alkohol unter Verwendung von Tierkohle - gereinigt werden kann. Die Ausbeute beträgt etwa 0,5 %, bezogen auf die Sensamen. Aussehen (kristalline Nadeln, die zu Drusen vereinigt sind) und Schmelzpunkt der Verbindung (177° C) stimmen mit den Literaturangaben überein.

IV. Zubereitung der Speisesenfproben

Soweit nicht industrielle Produkte Anwendung fanden, erfolgte die Herstellung der Proben auf folgende Weise:

Im Starmix zerschlagene Senfsamen (reine Braun- bzw. Gelbsaat oder Gemisch)	20	Teile
Kochsalz	1,5	Teile
Essigsäure 10 %ig	15	Teile
destilliertes Wasser	zu 100	Teilen

Nach dem Verschließen des Reaktionsgefäßes (Jodzahlkolben) bleibt der Ansatz unter häufigem Umschütteln einige Stunden stehen.

V. Gewinnung der methanolischen und wässrigen Auszüge der Senfsamen und Speisesenfproben

1. Wässrige Auszüge

Diese Extrakte fanden nur für qualitative Untersuchungen Verwendung. Für die papier- und Dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden 5 g Speisesenf mit etwa der doppelten Menge Wasser versetzt, verrührt und anschließend kräftig abgesaugt. Für die Reaktion mit FeCl_3 verwendet man 1 g Senf/10 ml Wasser. In diesem Fall genügt eine einfache Filtration. Die zerkleinerten Samen werden nach kurzem, kräftigem Anschütteln mit Wasser einer analogen Behandlung unterzogen.

2. Methanolische Extrakte

a. Samen

Eine genau abgewogene Menge (etwa 1 g) der entfetteten (8 Std. Soxhlet-Extraktion mit Petroläther) und staubfein zermahlenden Samen wird in einem 25 ml fassenden Erlenmeyer-Enghalskolben dreimal mit je 7 - 8 ml Methanol unter leichtem Schwenken im Wasserbad gelinde erwärmt. Die jeweils nach dem Absetzen der Pulverteilchen gewonnenen Extraktionsflüssigkeiten

vereinigt man in einem 25 ml fassenden Meßkolben und füllt nach dem Erkalten mit Methanol bis zur Marke auf.

b. Speisesenf

Infolge seiner zähflüssigen Konsistenz erlaubt der Speisesenf keine direkte Extraktion mit Methanol. Durch Verreiben von 10 g Senf mit getrocknetem Natriumsulfat und Kieselgel (für die Chromatographie), deren Mengen auf das notwendige Maß zu beschränken ist, läßt sich ein trockenes, feines Pulver gewinnen. Das durch Soxhlet-Extraktion gereinigte Kieselgel erfüllt die Aufgabe, ein Zusammenballen des Senfs bei Zugabe von NaSO_4 zu verhindern und einen Teil der Begleitstoffe des Senfs zu adsorbieren. Die Menge der beiden Substanzen ist je nach Art und Zustand des Speisesenfs verschieden und muß von Fall zu Fall erprobt werden. Ein Übermaß erschwert die anschließende Extraktion. Nun bringt man das innig verriebene, pulverförmige Gemisch quantitativ in einen Erlenmeyer-Enghalskolben und gewinnt auf ähnliche Weise wie unter a. beschrieben durch dreimaliges Extrahieren mit je 30 - 35 ml Methanol 100 ml eines glucosidhaltigen Speisesenfauszuges. Die zur vollständigen Extraktion der Glucoside notwendige Methanolmenge läßt sich den jeweiligen Erfordernissen anpassen, da die vereinigten Auszüge nicht unmittelbar verwendet werden. Nach dem Einengen auf ein Volumen von 10 - 15 ml mit Hilfe eines Rotationsverdampfers führt man sie in einen Meßkolben (15 ml) über und füllt bis zur Marke auf.

VI. Analytisch-chemische und physikalisch-chemische Verfahren

1. Papierchromatographische Untersuchungen

a. Qualitative Trennung der Glucoside

Das Auftragen der Substanzen erfolgte mit Schmelzpunktröhrchen

Sinigrinkonzentration: Etwa 200 mg/50 ml Methanol

Sinalbinkonzentration: Etwa 50 mg/50 ml Methanol

Das Sinalbin wird durch Erwärmen auf dem Wasserbad in Lösung gebracht.

Sinigrinlösung: Ein- bis zweimaliges Aufsetzen des Schmelzpunktröhrchens.

Lösungen von Sinalbin, Samen- und Speisesenfauszüge: Fünf- bis sechsmaliges Aufsetzen des Schmelzpunktröhrchens.

Fließmittel: Oberphase eines Gemischs aus n-Butanol-Essigsäure-Wasser 40:10:30. Es erwies sich als vorteilhaft, das Fließmittel erst nach mehr-tägigem Stehen zu verwenden.

Papiersorte: 2043 a und b 598 g (Schleicher & Schüll)

Laufzeit: 8 - 10 Std. 5 - 8 Std.

Laufrichtung: Absteigend

Besprühen: Dreimal mit einem Reagenz aus gleichen Teilen in 1n AgNO_3 und 10 %igem Ammoniak, zwischenzeitliches Erhitzen auf 120 - 140 ° C im Trockenschrank.

b. Durchführung der quantitativen Bestimmungen

Auftragen der glucosidhaltigen Lösungen: Streifenförmig an jeweils 10 Auftragungspunkten, die ineinander übergehen können, da die gesamte glucosidhaltige Zone verarbeitet wird. An den Rändern des Chromatogramms bringt man etwas abgesetzt jeweils gleichartige Vergleichsproben auf, die der Festlegung der Glucosidzonen des Hauptchromatogramms dienen.

Aufgetragene Mengen:

Sinigrin: 10 Streifen zu je 10 μl (zwei Mal 10 μl)

Sinalbin: 10 Streifen zu je 5 x 10 μl (oder ein Vielfaches)

Konzentration der Glucoside: Wie unter a. angegeben

Samen- und Speisesenfauszüge: 10 Streifen zu je 10 x 10 μl

Zum Auftragen der Lösungen wurden Mikropipetten der Firma Camag verwendet.

Papier: Schleicher und Schüll 2043 b säuregewaschen

Fließmittel n-Butanol-Essigsäure-Wasser 40:10:30 (Oberphase)

Laufrichtung: absteigend

Laufzeit: ca. 30 Stunden; Besprühen der Randstreifen wie unter a.

In der gleichen Kammer läuft ein Blindchromatogramm mit. Die beiden Randstreifen werden abgetrennt und durch Besprühen die Lage der Glucoside ermittelt. Mit Hilfe dieser Teststreifen lassen sich auf dem übrigen Chromato-

gramm die einzelnen Glucosidzonen festlegen. Nach dem Abtrennen des Glucosidareals aus dem Hauptchromatogramm wiegt man die Papiermenge genau ab, zerschneidet sie in kleine Stücke und eluiert in einem Erlenmeyerkölbchen (26 ml) dreimal mit je 8 ml destillierten Wassers durch heftiges Schwenken (5 Minuten). Die Eluate werden in einem Meßkolben (25 ml) gesammelt und nach dem Auffüllen mit destilliertem Wasser bis zur Marke durch Absaugen mit Hilfe eines gereinigten (wiederholtes Auskochen mit Königswasser) Glasfiliertiegels von Papierteilchen befreit. Die Vergleichsprobe wird in entsprechender Weise unter Verwendung des Blindchromatogramms gewonnen. Aus der Extinktionsdifferenz zwischen Meßprobe und Vergleichsprobe im Absorptionsmaximum der Glucoside bei 227 nm ergibt sich mit Hilfe entsprechender Eichkurven der Sinigrin- bzw. Sinalbinanteil. Die Messung erfolgt zweckmäßigerweise mittels eines Gerätes mit Schreiber, da hierbei ohne größeren Aufwand das gesamte Spektrum aufgezeichnet und damit Störungen leicht erkannt werden können. Kleinere Unregelmäßigkeiten im Verlauf des Spektrums, das dem einer reinen Glucosidlösung entsprechen soll, lassen sich durch Extrapolieren ausgleichen, während bei einer größeren Abweichung keine Aussage über den Glucosidgehalt möglich ist (Diskussion S. 53 - 54). Die Messungen erfolgten mit einem Spektralphotometer der Fa. Beckman DK 2A.

Da sich bei Gehaltsbestimmungen der Samen die ermittelten Glucosidwerte auf ein entfettetes, lufttrockenes Senfpulver beziehen, ist in diesen Fällen noch eine Umrechnung auf die ursprünglichen Samen erforderlich. Der Gehalt der Samen läßt sich nach folgender Formel berechnen:

$$G_S = G_{T_f} \cdot \frac{T_f}{100} ; \text{ wobei } G_{T_f} = G_E \cdot \frac{100 + W_L}{100}$$

G_S = Glucosidgehalt der Samen in Hundertteilen

T_f = fettfreie Senftrockensubstanz = 100 - (Fettgeh. + Wassergeh. d. Samen)

G_{T_f} = Glucosidgehalt der fettfreien Senftrockensubstanz

G_E = ermittelter Glucosidgehalt des entfetteten, lufttrockenen Pulvers

W_L = Wassergehalt des lufttrockenen Pulvers

Zur Berechnung des Glucosidgehalts in den Samen muß also neben dem Fettgehalt der Wassergehalt der Samen und des entfetteten, lufttrockenen Pulvers bestimmt werden.

2. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

a. Trennung der Glucoside

Bei Verwendung des Fließmittels n-Butanol-Essigsäure-Wasser 40:10:50 (Oberphase)

Dünnschichtplatte: Kieselgel G von MERCK

frisch bereitet, lufttrocken nicht aktiviert

Laufzeit: Dreimal etwa 3 Stunden bis die Fließmittelfront fast den oberen Rand der Platte erreicht zwischenzeitliches Trocknen während etwa 3 St. bei Zimmertemperatur bis kein Geruch nach Butanol wahrnehmbar ist

Besprühen der Platten: Vgl. S. 72 VI., 1a.

Bei Verwendung des Fließmittels Isopropanol-Essigsäure-Wasser im Verhältnis 80:20:10

Dünnschichtplatte: Kieselgel G von MERCK wie oben beschrieben

Laufzeit: 2 1/2 - 3 Stunden einmal bis nahe an den oberen Rand der Platte

Besprühen: Siehe S. 72 VI., 1a.

b. Nachweis des Cholins und des Sinapins

Dünnschichtplatte: Kieselgel G von MERCK, siehe oben

Laufzeit: Zweimal etwa 3 Stunden bis an den oberen Rand der Platte, zwischenzeitliches Trocknen

Fließmittel: n-Butanol-Essigsäure-Wasser 40:10:50 (Oberphase)

Sprühreagenz: Dragendorff's Reagenz

c. Nachweis des Rhodanids

Dünnschichtplatte: Kieselgel G von MERCK, nicht aktiviert

Fließmittel: Aceton-n-Butanol-Ammoniak (konz.)-Wasser 60:20:10:5

Sprühreagenz: 1 %ige salzsaure Lösung von FeCl_3

Das Verfahren wird in den Laboratoriumsbüchern für die Dünnschichtchromatographie von STAHL und RANDEARTH zwar nur für die Trennung der Halogenide angegeben, ließ sich jedoch zur Identifizierung des Pseudohalogenids Rhodanid anwenden.

3. Maßanalytische Bestimmung des Allylsenföls

a. Verfahren nach dem DAB VI

Siehe Deutsches Arzneibuch 6. Ausgabe S. 492

und Kommentar zum DAB VI, II. Band S. 217

b. Verfahren nach der Pharmacopoea Helvetica V

Siehe dort S. 831 - 832 und Kommentar zur Pharmacopoe Helvetica V S. 742

c. Verfahren nach WOJAHN (Hypoiodit-Methode)

Siehe WOJAHN, H., Pharmaz. Zentralhalle 91, 326 (1952)

4. Maßanalytische Bestimmung des Allylsenföls in Senfsamen und Speisesenf - Erfassung des Restsinigrins

a. Gehaltsbestimmung in den Senfsamen

Die Bedingungen der enzymatischen Spaltung der unter 3. a - c angeführten Verfahren, die zwischen der Gehaltsbestimmung in senföhlhaltigen Präparaten einerseits und in Senfsamen andererseits unterscheiden, wurden grundlegend verändert und lediglich der methodisch-chemische Teil mit geringen technischen Variationen übernommen. Im wesentlichen gelangte die Hypo-

jodit-Methode zur Anwendung, wobei unter dieser Bezeichnung demnach nur der chemische Teil zur Erfassung des Senföls zu verstehen ist.

Durchführung der Bestimmung:

Man bringt 5 g des zerkleinerten Saatgutes in einen 500 ml fassenden Schliff-rundkolben, fügt 50 ml Citratpufferlösung pH = 6,8 (S. 78) sowie 10 ml Myrosinase-Lösung zu und inkubiert unter häufigem Schütteln (Verschließen mit einem Schliffstopfen) 20 Minuten bei 55 - 60° C (Thermostat). Dann werden 30 ml Alkohol sowie 40 ml Wasser zugesetzt und nach Anschluß an einen absteigenden Schliff-Liebig-Kühler 80 ml in einen Erlenmeyer-Eng-halskolben destilliert, der etwa 10 ml Ammoniak (10 %ig) enthält. Während der Destillation muß der Vorstoß in die Ammoniakflüssigkeit eintauchen. Mit Hilfe eines Silicon-Entschäumers und durch vorsichtiges Erhitzen zu Beginn der Destillation gelingt es, eine störende Schaumbildung zu vermeiden. Sobald 80 ml übergegangen sind, wird die Destillation unterbrochen, der Inhalt des Erlenmeyer-Kolbens nach Zufügen einiger Siedesteinchen und Aufsetzen eines kleinen Trichters zunächst 10 Minuten gelinde, dann solange auf dem siedenden Wasserbad erwärmt, bis der Alkohol und der überschüssige Ammoniak zum größten Teil verdampft sind. Nach dem Erkalten führt man die Lösung in einen 100 ml Meßkolben über, füllt bis zur Marke auf und erhält auf diese Weise eine Stammlösung, die sich nach den Angaben WOJAHNs (siehe unter 3 c.) weiter bearbeiten läßt. Hierbei ist zu beachten, daß die vorgeschriebene Alkalität der Lösung und die angegebene Reaktionszeit unbedingt eingehalten werden.

b. Gehaltsbestimmung in Speisesenf

Zu 10 g Speisesenf fügt man 30 ml Alkohol und 100 ml Wasser. Aus diesem Ansatz wird das senföhlhaltige Destillat gewonnen. Weitere Behandlung des Destillats siehe oben an entsprechender Stelle unter 4 a., "Durchführung der Bestimmung".

c. Bestimmung des Restsinigrins in Speisesenf

Zu 10 g Senf fügt man 50 ml Citratpufferlösung (S. 78) und 10 ml Myrosinase-lösung und inkubiert 20 Minuten bei $55 - 60^{\circ}\text{C}$. Die weitere Behandlung des Ansatzes ergibt sich aus der unter 4 a. beschriebenen Anleitung. Der Gehalt an Restsinigrin errechnet sich aus der Differenz des auf diese Weise ermittelten Gesamtallylsenföls und des nach 4 b. bestimmten freien Allylsenföls.

5. Spektralphotometrische Bestimmung des Allylsenföls auf Grund der UV-Absorption des Thioharnstoff-Derivates

Die Messungen werden im Absorptionsmaximum des Allylthioharnstoffs bei 237 nm vorgenommen. In der Vergleichsküvette befindet sich destilliertes Wasser. Der Senfölgelhalt läßt mit Hilfe einer Eichkurve ermitteln. Als Meßgerät diene ein Spektralphotometer der Firma Beckman DK 2A.

a. Bestimmung des Allylsenfölgelhalts in den Samen

Man bringt 1 ml der nach 4 a. gewonnenen Stammlösung in einen 50 ml fassenden Enghals-Erlenmeyer-Kolben, fügt 20 ml destilliertes Wasser sowie einige Siedesteinchen zu und vertreibt nach Aufsetzen eines kleinen Trichters den restlichen Alkohol und Ammoniak durch Erhitzen auf einem Asbestdrahtnetz. Die Flüssigkeit wird in einen Meßkolben von 100 ml Fassungsvermögen gebracht und nach dem Auffüllen bis zur Marke als Meßprobe verwendet.

b. Bestimmung des Allylsenfölgelhalts in Speisesenf - Ermittlung des Restsinigrinanteils

Hierzu werden die nach 4 b. bzw. 4 c. gewonnenen Stammlösungen herangezogen und wie unter 5 a. angegeben verarbeitet. Infolge des gegenüber den Samen geringeren Gehalts verwendet man jedoch 10 - 50 ml der Stammlösungen. Der Zusatz von Wasser unterbleibt in diesen Fällen. Weiterverarbeitung wie bei 5 a.

6. Rhodanid-Methode zur Bestimmung des Sinalbins

Erforderliche Reagentien:

1. Rhodanidfreie Myrosinaselösung (S. 68)

2. Citratpufferlösung pH = 6,8

21 g Citronensäure-Monohydrat in 500 ml destilliertem Wasser und 200 ml 1n Natronlauge lösen, weiterhin mit Wasser und 1n NaOH-Lösung (zuletzt 0,1n) auf einen Liter auffüllen und dabei pH-Wert genau einstellen

3. Trichloressigsäurelösung 20 %ig

4. Bromwasser gesättigt

5. Kaliumarsenitlösung 3 %ig

6. Benzidin-Pyridin-Reagenz:

Benzidinhydrochlorid 0,2 g

Salzsäure 10 %ig 10 ml

Pyridin 25 ml

zu 100 ml mit destilliertem Wasser auffüllen

a. Erstellung einer Eichkurve

Konzentrationsbereich: 0,1 - 1,5 mg% KSCN in dest. Wasser

2 ml KSCN-Lösung in einem Reagenzglas

0,2 ml Bromwasser



gut durchmischen

30 Sekunden einwirken lassen

0,2 ml Arsenitlösg.



gut mischen, Bromreste von den Wänden durch Umschütteln restlos in das Reaktionsgemisch bringen

5 ml Benzidin-Pyridin-Reagenz



Schütteln, nach 20 Min. im Eppendorf-Photometer bei 492 nm (Hg-Linie) oder nach 25 Min. im Beckman-Photometer DK 2A bei 518 nm die Extinktion gegen eine Blindprobe (statt KSCN-Lösg. dest. Wasser) messen

b. Ermittlung des Temperaturoptimums der enzymatischen
Rhodanidbildung

In Vorversuchen wird diejenige Myrosinasekonzentration ermittelt, die eine vorgelegte Sinalbinmenge nur teilweise spaltet. Die zur Verfügung stehende Myrosinaselösung mußte auf 1:500 verdünnt werden.

Konzentration der Sinalbinlösungen: 10 - 20 mg/100 ml Wasser

Durchführung der Bestimmung:

20 ml Pufferlösung und 5 ml verd. Enzymlösung in
50 ml Meßkolben bei entspr. Temperatur vorwärmen

10 ml Sinalbinlösung ¹⁾ aus Pipette zufließen lassen	↓	15 Minuten bei ver- schiedenen Tempe- raturen inkubieren
---	---	--

(X) 5 ml Trichloressigsäure zufügen,
Schütteln, 2 Min. einwirken lassen,
mit Soda alkalisch machen

15 Minuten	↓	60° C
------------	---	-------

Mit HCl ansäuern, zur Marke auffüllen,
zentrifugieren, mit 2 ml Rhodanidbest.
wie unter 6 a. beschrieben durchführen.
Vergleichsprobe: Analoger Ansatz, statt
Sinalbinlösung destilliertes Wasser

- 1) Die Sinalbin-Stammlösung wird ebenfalls bei der entsprechenden Temperatur zur Marke aufgefüllt. Da die Pipette auf 20° C geeicht ist, tritt bei höheren Temperaturen ein geringer Fehler auf, der jedoch vernachlässigt wurde.

c. Überprüfung der Methode unter Verwendung von Reinglucosid

Neben 10 ml Sinalbinlösung werden 20 ml Citratpuffer und 5 ml Enzym-
lösung in einem 50 ml Meßkolben gebracht und 20 Minuten bei 55 - 60° C
inkubiert (Thermostat). Die weitere Bearbeitung des Ansatzes ergibt
sich nach 6 b. ab (X).

d. Gehaltsbestimmung in Gelbsenf Samen

Die Durchführung der Bestimmung verläuft wie unter 6 c., an Stelle der Sinalbinlösung werden 50 - 100 mg der entfetteten, lufttrockenen und staubfein zermahlenden Samen eingesetzt. Die Umrechnung auf den Gehalt der ursprünglichen Samen erfolgt auf die gleiche Weise wie bei VI 1 b.

e. Bestimmung des Restsinalbins in Speisesenf

Die Hauptprobe wird gemäß den Angaben unter 6 c. vorbereitet, wobei an die Stelle der Sinalbinlösung 0,5 g Speisesenf treten, die man mit der Pufferlösung in den Meßkolben spült. Außerdem ist hier die Berücksichtigung einer gesonderten Vergleichsprobe erforderlich (Diskussion S. 64-65). Hierzu stellt man einen Ansatz aus 0,5 g Senf her, der zusammen mit 20 ml Pufferlösung und 5 ml Trichloressigsäure in den Meßkolben gebracht wird. Nach gutem Durchmischen und anschließendem Neutralisieren mit Soda wird die Vergleichsprobe der gleichen Behandlung wie die entsprechende Hauptversuchsprobe unterzogen mit der Ausnahme, daß die Zugabe von Trichloressigsäure nach dem zwanzigminütigen Inkubieren bei 55 - 60° C nunmehr entfällt. Da eine genaue gleichgroße Senfwaage für den Hauptversuch und die Vergleichsprobe nur in Ausnahmefällen gelingt, werden die Rhodanidwerte gegen eine Blindprobe (6 a.), die über mehrere Stunden hinweg die gleich Extinktion aufweist, gemessen und auf eine Einwaage von 1 g Senf bezogen. Aus der Differenz der beiden Rhodanidwerte erfolgt dann die Berechnung des Sinalbingehalts der Speisesenfprobe.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegenden Untersuchungen liefern einen Beitrag zur Analytik der Senfölgucoside Sinigrin und Sinalbin sowie des Allylsenföls in Senfsaaten und Speisesenf. Es gelingt ferner, Einblicke in die Zusammenhänge des Bitterseins von Speisesenf zu gewinnen.

Im einzelnen resultieren folgende Ergebnisse:

1. Auf Grund papierchromatographischer Trennung der Senfölgucoside können die wertbestimmenden Komponenten der Samen in ihrer ursprünglichen glucosidischen Form nach dem Eluieren spektralphotometrisch im Absorptionsmaximum bei 227 nm ermittelt werden. Störende Substanzen, die als Verunreinigungen selbst aus säuregewaschenem Chromatographiepapier in die Meßlösung gelangen, lassen sich durch die Anwendung entsprechender Vergleichsproben kompensieren. Sinigrin ist infolge weitgehender Spaltung in nennenswerten Mengen nur in manchen frisch bereiteten Speisesenfprouben enthalten, die dann auch auf Grund ihres hohen Braunsenfanteils einen sehr scharfen Geschmack aufweisen. Sinalbin wird in wesentlich geringerem Maße gespalten. Es ist im Zusammenhang mit vorliegenden Untersuchungen erstmalig in Speisesenf quantitativ ermittelt worden.

Dünnschichtchromatographisch lassen sich neben den Glucosiden auch Sinapin und Cholin in den Samen und in Senfzubereitungen gut nachweisen (Cholin nur in älteren Extrakten).

2. Das Studium der enzymatischen Spaltung des Sinigrins in Senfsamen führte zu dem Ergebnis, daß die bisher bekannten Methoden zur Bestimmung des Allylsenföls in den Samen nach dem DAB VI, der PHARMACOPŒA HELVETICA V und dem Verfahren nach WOJAHN nicht unbedingt die gesamte Menge des Allylsenföls erfassen. Unter den jeweils angegebenen Bedingungen verläuft die Reaktion häufig nur unvollständig, besonders in enzymschwachen Saaten. Die genannten Verfahren sind daher als Konventionsmethoden zu betrachten.

Die als optimal erkannten Versuchsbedingungen sind durch folgende Einzelheiten gekennzeichnet:

- a. Zusätzliche Verwendung eines Myrosinasepräparats
- b. Inkubation bei $55 - 60^{\circ} \text{C}$, Inkubationszeit: 15 - 20 Min.
- c. Verwendung einer Citratpufferlösung $\text{pH} = 6,8$

3. Das spektralphotometrische Verfahren zur Erfassung des Allylsenföls auf Grund der UV-Absorption seines Thioharnstoff-Derivats stellt in der auf die Erfordernisse einer Gehaltsbestimmung in Braunsaat und Speisesenf abgestimmten Form eine interessante Bereicherung der Analytik auf diesem Gebiet dar.

Mit den genannten Verfahren läßt sich bei der Untersuchung von Speisesenf neben dem freien Allylsenföl nach Zufügen eines Myrosinasepräparats auch ein "Restsinigrinanteil" ermitteln. Während das Sinigrin in vielen Speisesenfprouben nicht mehr nachweisbar ist, kommt der Restglucosidbestimmung hinsichtlich des Bitterseins von Senf Bedeutung zu.

4. Das neu erarbeitete und als Rhodanid-Methode bezeichnete Verfahren zur Bestimmung des Sinalbins auf der Grundlage der enzymatischen Spaltung des Glucosids unter Rhodanidbildung ermöglicht erstmalig Gehaltsbestimmungen in Gelbseuten und Speisesenfbereitungen. Die Ermittlung des Temperaturoptimums der zugrunde liegenden Reaktion bestätigt die schon für die Spaltung des Sinigrins beschriebenen Befunde.

5. Die unterschiedliche Reaktion von Gelb- und Braunsenfansätzen mit Eisen-(III)-chlorid läßt sich zu einer qualitativen Differenzierung der beiden Senfarten heranziehen. Die quantitative Auswertung der Reaktion ist nicht möglich, da die Umsetzung nicht stöchiometrisch verläuft.

6. Der bittere Geschmack von Speisesenfprouben ist auf die Senfölglycoside, in erster Linie Sinigrin zurückzuführen. Daneben kommen in weit

geringerem Maße das Sinalbin sowie Sinapinverbindungen in Frage, die jedoch vorwiegend adstringierende Eigenschaften aufweisen. Im Falle der Glucoside geht die Erscheinung letzten Endes auf einen Mangel an Myrosinase zurück, die z.B. bei Verwendung von Kernmehl zur Herstellung eines Speisesenfs zum Teil zusammen mit den Schalen entfernt wird.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALDRIDGE, W. N.:
Analyst (London) 69, 262 (1944)
2. ANDRE, E. u. M. CARBOUERE
C.R. hebd. Séances Acad. Sci 233, 673 (1951);
Ref.: C. 1952 I 3749
3. ANDRE, E. u. M. CARBOUERE
C.R. hebd. Séances Acad. Sci 237, 1274 (1955);
Ref.: C. 1955 I 126
4. VON BABO, L. u. M. HIRSCHBRUNN
Liebigs Ann. Chem. 84, 10 ff (1852)
5. BAUER, K. H. u. A. HOLLE
Pharmaz. Zentralhalle 78, 545 (1937)
6. BEK, F.
Chemiker-Ztg. 23, Rp 99 (1899)
7. BERKA, A. u. J. ZYKA
Ceskoslov. Farmac. 4, 222 (1955)
Ref.: C. 1956 8433
8. BÖHME, H.
Pharmaz. Zentralhalle 89, 57 (1950)
9. BUSSY, A.
Liebigs Ann. Chem. 34, 223 (1840)
10. DAB VI S. 492
- 10a. KOMMENTAR zum DAB VI II. Band S. 217
11. DIETERICH, E.
Pharmaz. -Ztg. 45, 767 (1900)
12. DIRCHS, K.
Landwirtsch. Versuchsstat. 28, 174 (1883)
13. ETTLINGER, M. G. u. A. J. LUNDEEN
J. Amer. chem. Soc. 78, 1952 u. 4172 (1956)
14. ETTLINGER, M. G. u. A. J. LUNDEEN
J. Amer. chem. Soc. 79, 1764 (1957)

15. VON EULER, H. u. ST. E. ERIKSON
Fermentforschung 8, 518 (1926)
16. GADAMER, J.
Arch. Pharmaz. 235, 44 u. 83 ff (1897)
17. GADAMER, J.
Arch. Pharmaz. 237, 110 u. 372 (1899)
18. GAINES, R. D. u. K. J. GOEHRING
Biochem. biophys. Res. Commun. 2, 207 (1960)
19. GREENISH, H. G. u. D. J. BARTLETT
Pharmac. J. 88, 203 (1912)
20. HALBACH, H. W.
Dissertation TH Aachen 1959
21. HASELHOFF, E.
Z. Unters. Nahr. u. Genußm. 1, 235 (1898)
22. HERISSEY, H. u. R. BOIVIN
J. Pharmac. Chim. 6, 337 (1927)
Ref.: C 1928 I 358
23. KJAER, A. u. J. CONTI
Acta chem. Scand. 7, 1011 (1953)
24. KJAER, A. u. J. CONTI
Acta chem. Scand. 8, 295 (1954)
25. KJAER, A., J. CONTI u. K. A. JENSEN
Acta chem. Scand. 7, 1267 u. 1271 (1953)
26. KJAER, A. u. R. GMELIN
Acta chem. Scand. 9, 542 (1955)
27. KJAER, A. u. R. GMELIN
Acta chem. Scand. 10, 335 (1956)
28. KJAER, A. u. R. GMELIN
Acta chem. Scand. 11, 577 (1957)
29. KJAER, A., R. GMELIN u. K. A. JENSEN
Acta chem. Scand. 10, 26 u. 432 (1956)
30. KJAER, A., R. GMELIN u. J. LARSEN
Acta chem. Scand. 9, 1143 (1955)

31. KJAER, A. u. K.A.JENSEN
Acta chem. Scand. 10, 141 (1956)
32. KJAER, A., J.CONTI u. J.LARSEN
Acta chem. Scand. 7, 1276 (1953)
33. KJAER, A., A.MARCUS u. J.CONTI
Acta chem. Scand. 7, 1370 (1953)
34. KJAER, A. u. J.LARSEN
Acta chem. Scand. 8, 699 (1954)
35. KJAER, A. u. K.RUBINSTEIN
Acta chem. Scand. 8, 598 u. 1335 (1954)
36. KLEIN, G.
Handbuch der Pflanzenanalyse, Spezielle Analyse 2. Teil Organische Stoffe II 2. Hälfte S. 1090
Verlag Julius von Springer Wien 1932
37. MOMBELET, S. u. G.DASTUGUE
Ann. pharmac. franc. 13, 519 (1955);
Ref.: C. 1958 10729
38. MORELL, S. u. K.P.LINK
J. biol. Chemistry 114, 123 (1936)
39. MORVILLEZ, F. u. R.MEESEMAECKER
J. Pharmac. Chim. 30, 236 (1924)
40. NEUBERG, C. u. O.SCHOENEBECK
Biochem. Z. 265, 223 (1933)
41. NEUBERG, C. u. J.WAGNER
Biochem. Z. 174, 457 (1926)
42. NEUBERG, C. u. J.WAGNER
Biochem. Z. 161, 492 (1925)
43. PASSON, M.
Z. angew. Chem. (1896) 422
44. PHARMACOPOEA HELVETICA V S. 831 - 832
- 44a KOMMENTAR zur PHARMACOPOEA HELVETICA V S. 742
45. PRITZKER, J. u. R.JUNGKUNZ
Dtsch. Essigind. 28, 24 ff u. 244 ff (1924)

46. REESE, E.T., R.C. CLAPP u. M. MANDELS
Arch. Biochem. Biophysics 75, 228 (1958)
47. ROJAHN, C.A.
Apotheker-Ztg. 50, 1095 (1935)
48. SALKOWSKI, H.
Ber. dtsch. chem. Ges. 22, 2137 (1889)
49. SANDBERG, M. u. O.M. HOLLY
J. biol. Chemistry 96, 443 (1932)
50. SCHLICHT, A.
Z. analyt. Chem. 30, 661 (1891)
51. SCHNEIDER, W. u. F. WREDE
Ber. dtsch. chem. Ges. 47, 2225 (1914)
52. SCHNEIDER, W., H. FISCHER u. W. SPECHT
Ber. dtsch. chem. Ges. 63, 2787 (1930)
53. SCHULTZ, O.E. u. R. GMELIN
Z. Naturforsch. 7b, 500 (1952)
54. SCHULTZ, O.E. u. R. GMELIN
Z. Naturforsch. 8b, 151 (1953)
55. SCHULTZ, O.E. u. R. GMELIN
Z. Naturforsch. 9b, 27 (1954)
56. SCHULTZ, O.E. u. R. GMELIN
Arch. Pharmaz. 287, 342 (1954)
57. SCHWARZE, P.
Naturw. 36, 88 (1949)
58. STOA, K.F.
Z. analyt. Chem. 140, 395 (1953)
59. SZAHLENDER, K.
Ber. ung. pharmaz. Ges. 14, 22 (1938)
Ref.: C. 1938 I 3079
60. TERRY, R.C. u. J.W. CORRAN
Analyst 64, 164 (1939)
61. VIEHOEVER, A. u. W.L. NELSON
J. Assoc. off. agric. Chemists 21, 488 (1938);
Ref.: C. 1939 I 839

62. VIRTANEN, I.A.
Angew. Chem. 74, 374 (1962)
63. WAGNER, H., L.HÖRHAMMER u. H.NUFER
Arzneimittel-Forsch. 15, 453 (1965)
64. WEHRMANN, FR., K.WEGENER, FR.H.BRAUNWARTH u.K.MEYER
Arch. Pharmaz. 253, 306 (1915)
65. WEIS-FOGH, O.
Dansk Tidsskr. Farmaci 28, 117 (1956)
Ref.: Pharmaz. Zentralhalle 95, 113 (1956)
66. WILL, H. u. W.KÖRNER
Liebigs Ann. Chem. 125, 260 (1863)
67. WILL, H. u. A.LAUBENHEIMER
Liebigs Ann. Chem. 199, 150 (1879)
68. WILLIAMS, R. u. H.M.KIRBY
Science (New York) 107, 481 (1948)
69. WOJAHN, H.
Pharmaz. Zentralhalle 91, 326 (1952)

Lebenslauf

Am 23. August 1938 wurde ich als Sohn des Landwirts und Weinhändlers Franz Nimführ und seiner Ehefrau Rosalie, geborene Köpf, in Urbau geboren. Dort besuchte ich von 1944 bis zur Vertreibung 1945 die Volksschule und legte im März 1957 am Parler-Gymnasium in Schwäbisch Gmünd die Reifeprüfung ab. Es folgte das Studium der Lebensmittelchemie an den Universitäten Würzburg und München, das ich im November 1962 mit der lebensmittelchemischen Staatsprüfung in München abschloß.

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Rudolf Springer in der Zeit vom 1. Januar 1963 bis 31. März 1966 durchgeführt.

A. Staudenraus Univ.-Druckerei Würzburg

A. Staudenraus Univ.-Druckerei Würzburg